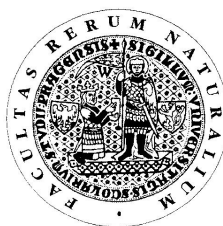


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lenka Pohlová

Studium potenciálních inhibitorů angiogeneze pomocí „Capillary-like tube formation“ testu

The study of potential angiogenesis inhibitors by „Capillary-like tube formation“ test

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Miroslav Hájek, PhD.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru IOCB #RVO: 61388963.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele Mgr. Miroslava Hájka, PhD. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. srpna 2012.

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Mgr. Miroslavu Hájkovi, PhD. za často příjemnou atmosféru v laboratoři a za vše, co mne naučil. Děkuji také konzultantce RNDr. Heleně Dračínské, PhD. za cenné připomínky k textu. Poděkování patří také Ing. Petru Jansovi, PhD. a Ing. Viktoru Kolmanovi, PhD. za syntézu studovaných sloučenin. Velké díky patří celému oddělení Biochemické farmakologie antimetabolitů ÚOCHB AV ČR, zejména Ing. Janě Günterové za pomoc při měření na průtokovém cytometru, Mgr. Ludmile Tovčigrečko a Karolíně Müllerové za příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji mým rodičům a bratrům za všestrannou podporu nejen při studiu.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	FYZIOLOGICKÁ VERSUS NÁDOROVÁ ANGIOGENEZE	2
2.1.1	<i>Mechanismus fyziologické angiogeneze.....</i>	3
2.1.2	<i>Mechanismus nádorové angiogeneze.....</i>	4
2.2	REGULACE PATOFYZIOLOGICKÉ ANGIOGENEZE	7
2.2.1	<i>Role cyklooxygenáz v regulaci patofyziologické angiogeneze</i>	8
2.2.2	<i>Role oxidu dusnatého a NO-syntázy v regulaci patofyziologické angiogeneze</i>	9
2.3	INHIBICE ANGIOGENEZE V PROTINÁDOROVÉ LÉČBĚ	10
2.3.1	<i>Obecné rozdělení dle místa zásahu</i>	10
2.3.2	<i>Monoklonální protilátky jako inhibitory angiogeneze</i>	11
2.3.3	<i>Nízkomolekulární inhibitory angiogeneze.....</i>	12
2.4	STUDOVANÉ 4,6-DICHLOROPYRIMIDINOVÉ DERIVÁTY.....	15
2.5	POUŽITÉ IN VITRO METODY STUDIA POTENCIÁLNÍCH INHIBITORŮ ANGIOGENEZE.....	16
2.5.1	<i>„Capillary-like tube formation test“</i>	16
2.5.2	<i>„Wound healing assay“</i>	17
2.6	SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH ÚČINKŮ TESTOVANÝCH LÁTEK	18
2.6.1	<i>Stanovení vlivu 4,6-dichloropyrimidinových derivátů na buněčnou proliferaci u HUVEC a CCRF CEM.....</i>	18
2.6.2	<i>Průtoková cytometrie</i>	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1	PŘÍSTROJE, MATERIÁL A POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	20
3.2	KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE HUVEC	22
3.3	KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE CCRF CEM	22
3.4	STANOVENÍ Vlivu 4,6-DICHLOROPYRIMIDINOVÝCH DERIVÁTŮ NA BUNĚČNOU PROLIFERACI POMOCÍ XTT TESTU	23
3.5	„TUBE FORMATION ASSAY“	24
3.6	WOUND HEALING ASSAY	24
3.7	SLEDOVÁNÍ SCHOPNOSTI STUDOVANÝCH LÁTEK INDUKOVAT APOPTÓZU U HUVEC BUNĚK	25
3.8	SLEDOVÁNÍ Vlivu STUDOVANÝCH LÁTEK NA DISTRIBUCI BUNĚČNÉHO CYKLU CCRF CEM A HUVEC	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28
4.1	„TUBE FORMATION ASSAY“	28
4.2	Vliv STUDOVANÝCH LÁTEK NA INDUKCI APOPTÓZY U HUVEC	29
4.3	POZOROVANÉ ZMĚNY MORFOLOGIE HUVEC PO JEJICH OVLIVNĚNÍ 4,6-DICHLOROPYRIMIDINOVÝMI DERIVÁTY	32
4.4	„WOUND HEALING ASSAY“	33
4.5	INHIBICE BUNĚČNÉ PROLIFERACE	36
4.6	DISTRIBUCE BUNĚČNÉHO CYKLU HUVEC A CCRF CEM	38
5	ZÁVĚR	40
6	LITERATURA.....	42

Seznam zkratek

Ang-1	angiopoetin-1
Ang-2	angiopoetin-2
CCRF CEM	buněčná linie lidské akutní lymfoblastické leukémie
COX-1	cyklooxygenáza-1
COX-2	cyklooxygenáza-2
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB	endoteliální buňky
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
eNOS	endoteliální NO-syntáza
E-STIM	kultivační medium pro endoteliální buňky
FBS	fetální bovinní sérum
FGF	fibroblastový růstový faktor
FITC	fluorescein isothiokyanát
g	tíhové zrychlení
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor
hod	hodina
HUVEC	lidské žilní endoteliální buňky
IL-8	interleukin-8
iNOS	inducibilní NO-syntáza
kg	kilogram
mg	miligram
ml	mililitr
mm	milimetr
mmol/l	milimol na litr
MMPs	matrixmetaloproteinázy
mRNA	madiátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nm	nanometr

nNOS	neuronální NO-syntáza
NO	oxid dusnatý
PBS	fosfátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor
PDGFR	receptor destičkového růstového faktoru
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PI	propidium jodid
ST	staurosporin
TGF	transformující růstový faktor
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
VHL	von Hippel-Lindau (protein)
μmol/l	mikromol na litr
μM	mikromolární
°C	stupeň Celsiův

1 Úvod

Růst a vývoj nádoru je podmíněn přísunem živin a kyslíku. Tyto potřeby jsou do jisté velikosti nádoru, přibližně 2 mm, zajištěny prostou difuzí. Po překročení této velikosti se nádor dostává do hypoxického stavu, který vede k tvorbě vlastního cévního zásobení nádoru procesem zvaným nádorová angiogeneze. Ten mu následně umožní další růst a metastázování [1].

Nádorová angiogeneze je několikastupňový komplexní proces regulovaný mnoha proangiogenními i antiangiogenními faktory, které hrají důležité role v jednotlivých etapách tohoto děje. Inhibice angiogeneze se tak stává důležitým léčebným cílem, jehož úkolem je potlačit abnormální signální dráhy vedoucí k narušení rovnováhy mezi proangiogenními a antiangiogenními faktory v oblasti nádoru. Princip využití antiangiogenních látek v terapii nádorů spočívá v zabránění vývoje cévního zásobení tumorů a tím zamezení proliferace nádorových buněk a metastázování nádoru [1,2]. Vývoj těchto látek se tedy jeví jako slibný přístup v terapii solidních nádorů.

Stimulace angiogeneze byla prokázána nejen u klasických proangiogenních faktorů, jakým je například vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), ale i u zánětlivých mediátorů jako je prostaglandin E₂ (PGE₂) nebo oxid dusnatý (NO). PGE₂ vzniká konverzí kyseliny arachidonové za účasti enzymu cyklooxygenázy (COX), jejíž inducibilní forma, cyklooxygenáza-2 (COX-2), je exprimována v patologických stavech (zánětlivé nebo nádorové onemocnění) a je spojována se stimulací angiogeneze [3]. NO vzniká z L-argininu působením NO-syntázy (NOS). Bylo prokázáno, že VEGF zvyšuje expresi COX-2 na úrovni mRNA i proteinu, má vliv na zvýšení hladiny PGE₂ a pozitivně reguluje expresi NOS [3,4].

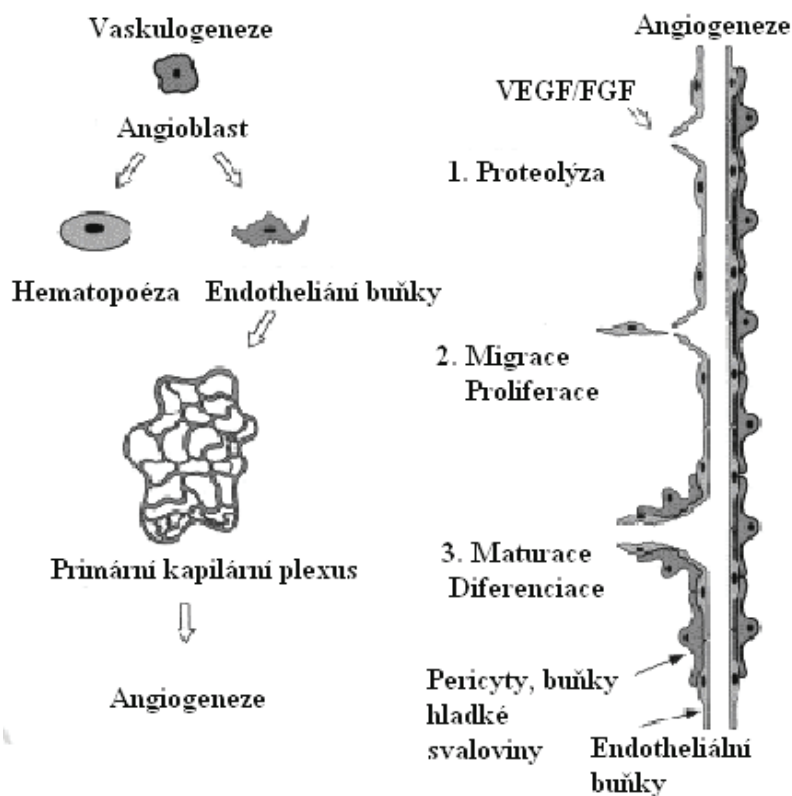
Známými inhibitory COX-2 jsou nesteroidní protizánětlivé léky např. aspirin nebo ibuprofen, které mají i prokázaný antiangiogenní účinek a snižují hladinu některých angiogenních faktorů [5,6].

U látek, jimž se věnuje tato práce, byla zjištěna inhibice COX-2 a inducibilní formy NOS (Dr. Zídek, nepublikované výsledky), a proto byly vybrány pro testování jejich vlivu na základní kroky angiogenního procesu. Cílem této bakalářské práce je prozkoumání vlivu vybraných 4,6-dichloropyrimidinových derivátů s prokázanými protizánětlivými účinky na migraci a diferenciaci lidských endoteliálních buněk (HUVEC) a prozkoumání jejich vlivu na buněčnou proliferaci a distribuci buněčného cyklu HUVEC a lidských leukemických buněk CCRF CEM.

2 Teoretická část

2.1 Fyziologická versus nádorová angiogeneze

Tvorba a formování cévního systému jedince začíná v embryonálním stadiu, z prekursorů endoteliálních buněk – angioblastů, v procesu zvaném vaskulogeneze. V tomto procesu angioblasty proliferují, spojují se a vyváří tak primitivní cévní síť – tzv. primární kapilární plexus. Pučením a větvením nových cév je primární kapilární plexus remodelován a je z něj utvářena vaskulatura plodu nutná pro správnou tvorbu dalších tkání a orgánů. Tato remodelace je přísně regulována mnoha faktory a nazývá se angiogeneze [7] (Obr. 1).



Obr. 1: Vaskulogeneze a angiogeneze, upraveno dle [8].

Fyziologická angiogeneze se v postnatálním období uplatňuje jen v několika málo procesech, a to při obnově endometria v menstruačním cyklu ženy nebo při hojení ran [9].

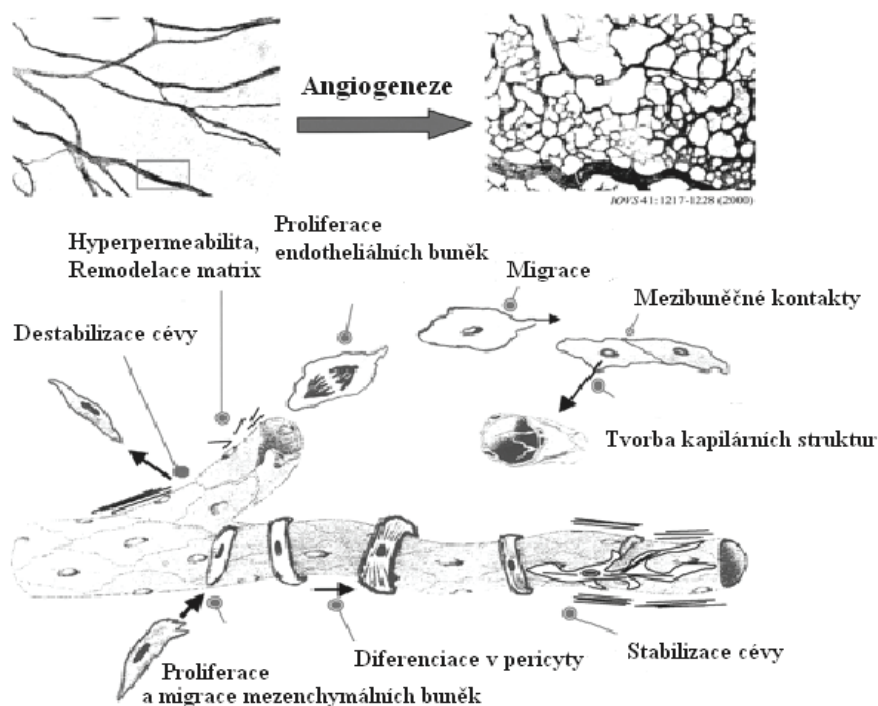
Patologická angiogeneze (resp. deregulace fyziologické angiogeneze) je proces provázející různé chronické zánětlivé stavy jako lupénka nebo revmatoidní artritida, a především vývoj nádoru, ve kterém může zánět hrát také důležitou roli, zejména u některých druhů karcinomu (konečníku, prsu, prostaty) [9].

2.1.1 Mechanismus fyziologické angiogeneze

Mechanismus fyziologické angiogeneze je realizován koordinací několika částečně nezávislých procesů (Obr. 2). Prvním předpokladem pro remodelaci a růst nových cév je uvolnění pericytů (buňky obklopující endoteliální buňky) z povrchu endotelia, čímž dochází k destabilizaci cévy. Následuje přechod endoteliálních buněk z klidového stavu do plastického proliferativního fenotypu [7].

Hyperpermeabilita cévní stěny indukovaná pomocí VEGF způsobí sekreci proteáz a jiných složek z krevního řečiště. Endoteliální buňky proliferují, migrují skrze narušenou extracelulární matrix a tvoří kapilární síť, v níž může proudit krev. Zároveň proliferují mezenchymální buňky, migrují podél cévy a nakonec diferencují v pericyty [7].

Konečnou fází je stabilizace nově vzniklé cévy uvedením endoteliálních buněk do klidového stadia, posílením mezibuněčných kontaktů a zformováním nové matrix [7].



Obr. 2: Mechanismus fyziologické angiogeneze, upraveno dle [7].

Fyziologické angiogeneze se účastní celá řada mediátorů. Nejdůležitější z nich jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1, str. 4), která stručně shrnuje i biologickou aktivitu.

Tab. 1: Faktory regulující fyziologickou angiogenezi a jejich biologická aktivita v endoteliálních buňkách (EB).

Faktor	Biologická aktivita (na EB)	Citace
VEGF	- zvyšování permeability cévní stěny - stimulace proliferace - inhibice apoptózy	[10,11] [11] [12]
PDGF	- stimulace proliferace - vliv na tvorbu tubulárních struktur - pozitivní regulace ostatních růstových faktorů	[13] [13] [14]
FGF	- stimulace proliferace - vzrůst migrace - stimulace tvorby tubulárních struktur	[15] [16] [17]
Ang1	- stabilizace bazální membrány	[18]
Ang2	- destabilizace bazální membrány	[19]
EGF, TGF-α	- stimulace proliferace	[20]

Účastníky regulace jsou také negativní regulátory, které naopak angiogenezi potlačují a za normálních okolností jsou s těmi pozitivními v rovnováze. Hlavními antiangiogenními faktory jsou trombospondin a endostatin [21].

Trombospondin, multifunkční glykoprotein obsažený v extracelulární matrix, inhibuje proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Endostatin je membránový protein a kromě inhibice proliferace endoteliálních buněk indukuje jejich apoptózu [21].

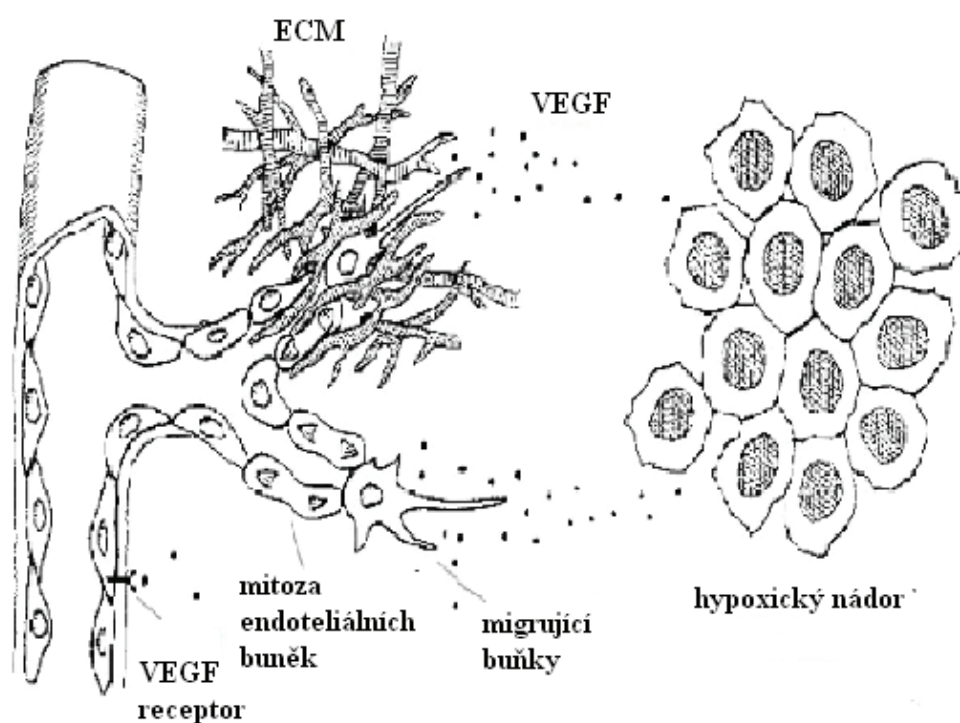
Cévy vzniklé fyziologickou angiogenezí jsou celistvé, uspořádané, organizované v arterie, vény a kapiláry a jsou stabilizované pericyty. Endoteliální buňky, které tvoří jejich vnitřní výstelku, jsou organizovány do jedolité vrstvy, jsou diploidní a za normálních okolností v klidovém stavu [22].

2.1.2 Mechanismus nádorové angiogeneze

Stejně jako u fyziologické angiogeneze je proces nádorové angiogeneze realizován několika nezbytnými kroky – destabilizací a degradací bazální membrány cévy, proliferací a migrací endoteliálních buněk, formováním kapilárních struktur a nakonec stabilizací nově vzniklých cév [7,23]. Nicméně v některých ohledech se od sebe tyto dva procesy liší.

Za fyziologických okolností dochází ke spuštění angiogeneze pouze v omezeném množství případů. Iniciátory nádorové angiogeneze jsou nádorové buňky, ve kterých dochází

ke zvýšené expresi některých proangiogenních faktorů především vlivem hypoxického prostředí [23] (Obr. 3). Tyto faktory indukují tvorbu tubulárních struktur, jejichž úkolem je zajistit nádorovým buňkám výživu a kyslík, stimulací proliferace endoteliálních buněk či zvýšením exprese proangiogenních faktorů v nenádorových buňkách, v nichž je za normálních okolností jejich exprese téměř potlačena. Děje, vedoucí k deregulaci angiogeneze ve prospěch proangiogenních faktorů, jsou označovány pojmem „angiogenní přepnutí“ [7,23,24].



Obr. 3: Interakce spojené s nádorovou angiogenezí, upraveno dle [25].

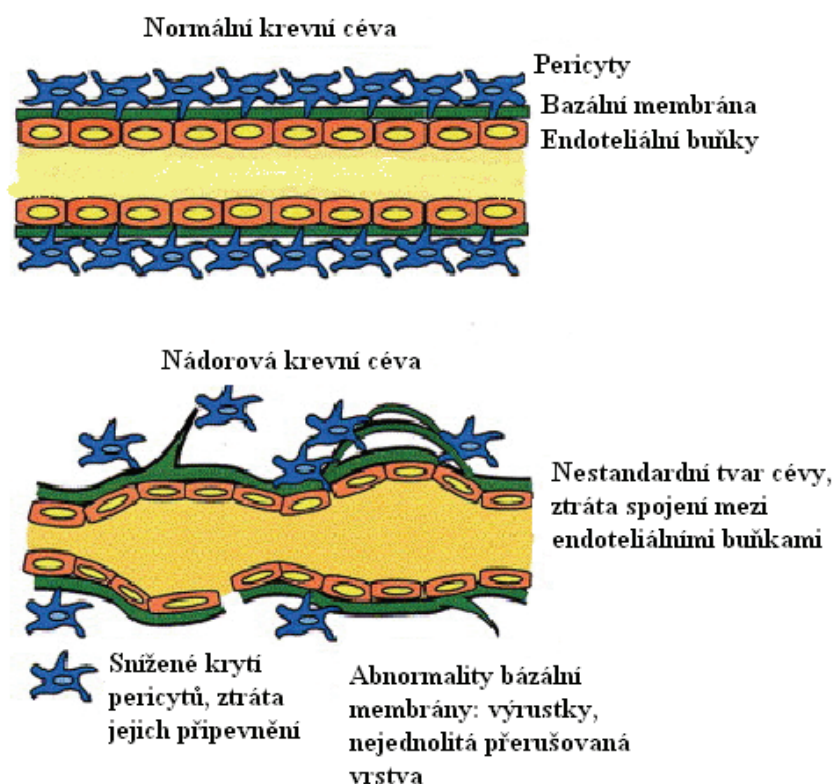
Proangiogenní faktory jsou pro fyziologickou i nádorovou angiogenezi až na některé výjimky stejné. Hlavní stimulatory nádorové angiogeneze a jejich role v nádorové angiogenezi jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 2, str. 6).

Tab. 2: Faktory regulující nádorovou angiogenezi

Faktor	Role v nádorové angiogenezi	Citace
VEGF	- sekretován mnoha nádorovými buňkami - míra jeho exprese koreluje s hustotou mikrokapilár a také se špatnou prognózou pacientů - jeho inhibice snižuje hustotu nádorových cév a potlačuje růst nádoru	[26] [27] [28]
FGF	- jeho inhibice potlačuje tvorbu nádorových cév <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> , a růst nádoru <i>in vivo</i> - indukce exprese VEGF v nádorových buňkách a VEGFR v endoteliálních buňkách	[29] [30]
Ang-2	- indukovaný v EB existujících cév sousedících s nádorem vede k regresi cév - indukovaný v EB nádorových cév vede k cévní plasticitě a růstu	[31] [31]
IL-8	- mitogenní a chemotaktický pro HUVEC <i>in vitro</i> - zvýšená exprese → zvýšená invazivnost, neovaskularizace a metastatický potenciál nádorových buněk	[32] [33]
MMPs	- rozrušování bazální membrány a extracelulární matrix → usnadnění migrace EB	[34]

Dalším nezanedbatelným rozdílem, oproti fyziologické angiogenezi, je morfologie nově vzniklé cévy. Vaskulatura vzniklá nádorovou angiogenezi je strukturně i funkčně abnormální [35]. Cévy jsou křehké, nekompletní a nesouvislé, pericyty jsou uvolněné nebo úplně chybí [36], (Obr. 4, str. 7). Navíc nekontrolovanou proliferací nádorových buněk dochází ke zvýšení tlaku v nádoru, čímž je komprimována intratumorální krev a to vede ke vzniku abnormálního mikroprostředí nádoru. To se projeví poškozeným zásobováním, intersticiální hypertenzí (vysoký mezitkáňový tlak) a hypoxií. Navíc dochází případnému zhoršenému dopravování cytostatik do místa zásahu [37].

Odlišné jsou i endoteliální buňky v nádorové vaskulatuře. Jsou náhodně asociované a tvoří souvislou vrstvu jako u zdravých cév. Rychleji proliferují, jsou odolnější proti apoptotickým stimulům a vykazují cytogenetické abnormality – aneuploidita, abnormální centrozómy [22].



Obr. 4: Morfologické rozdíly mezi normální a nádorovou cévou, převzato z [38].

2.2 Regulace patofyziologické angiogeneze

Regulace probíhá na úrovni transkripce genů, kterou řídí tzv. hypoxií indukované faktory (HIF-1) v závislosti na koncentraci kyslíku. HIF-1 β je exprimován konstitutivně, zatímco exprese HIF1- α vzrůstá s klesající koncentrací kyslíku [39]. HIF-1 α prochází do jádra, kde dimerizuje s HIF-1 β , tvoří aktivní HIF-1 komplex, který se váže na DNA sekvenci v promotorech cílových genů. Tato konzervovaná sekvence se nazývá „hypoxia-responsive element“ (HRE) a je obsažena například v promotoru genu pro VEGF nebo COX-2. Navázáním HIF-1 komplexu na tuto sekvenci je indukována transkripce těchto genů [40,41].

Zvýšenou expresi VEGF podporují také mutace onkogenů. Například mutace genu pro von Hippel-Lindau (VHL) protein, který je důležitou součástí komplexu ubikvitin ligázy zodpovědné za degradaci HIF-1 α , vede ke zvýšení exprese VEGF [42].

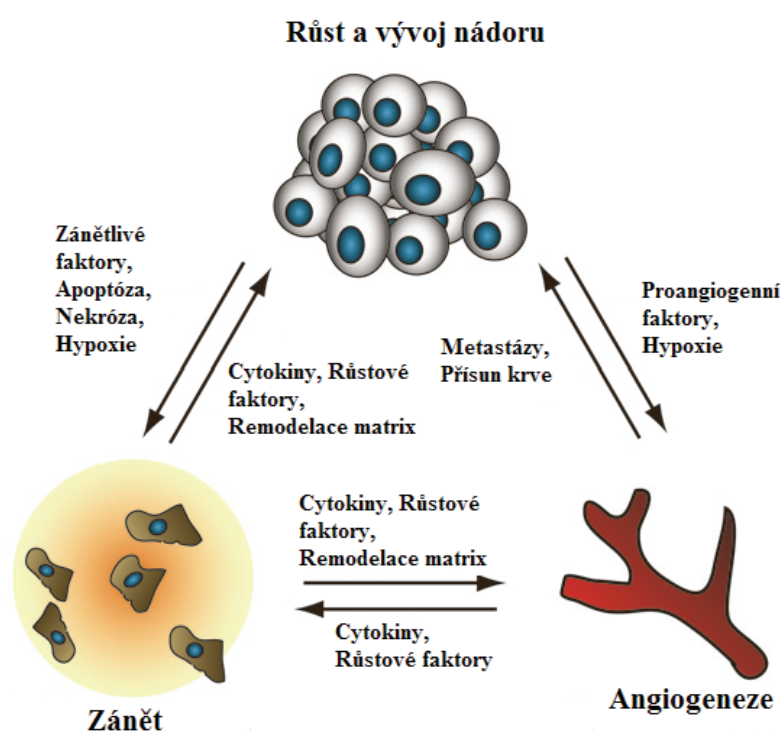
Za normoxických podmínek je HIF-1 α velmi nestabilní, protože je hydroxylován prolyl hydroxylázami (enzymy aktivní za přítomnosti kyslíku) a následnou polyubikvitinylací je degradován v proteazomu [42].

Nicméně je známa aktivace HIF-1 α i za nehypoxických podmínek, která je indukována aktivací jiné signální dráhy. Za tuto, na kyslíku nezávislou, aktivaci (uplatňující se u

angiogeneze spojené se zánětlivými onemocněními) je zodpovědných hned několik molekul, mimo jiné i PGE_2 a NO [40].

2.2.1 Role cyklooxygenáz v regulaci patofyziologické angiogeneze

Ačkoliv první zmínky o souvislosti mezi zánětem a nádorovým bujením sahají daleko do minulého století, více byla tato souvislost zkoumána relativně nedávno. Bylo zjištěno, že některé typy nádorů (především karcinom konečníku, prsu a prostaty) jsou provázeny chronickým zánětem, který se podílí na nádorovém mikroprostředí a pozitivně reguluje jeho růst (Obr. 5) [43].



Obr. 5: Vztah mezi růstem nádoru, zánětem a angiogenezí, upraveno dle [42].

Cyklooxygenáza (COX) je enzym katalyzující konverzi kyseliny arachidonové na prostaglandiny, tedy zásadní krok v zánětlivém procesu. Vyskytuje se ve dvou izoformách. COX-1 je konstitutivní forma exprimovaná v různých tkáních za fyziologických podmínek a COX-2 je indukibilní forma, kterou exprimují nádorové a zánětlivé buňky. Zvýšená exprese tohoto proteinu je tedy pozorována u patologických stavů, které zahrnují zánětlivý proces, a je také spojována se zvýšenou angiogenezí v prostředí nádoru, například v případě kolorektálního karcinomu [44]. Je však známa i konstitutivní exprese COX-2 nalezená v mozkové tkáni. Fyziologicky je COX-2 indukována také během ovulace [45].

Zvýšená exprese COX-2 v buňkách kolorektálního karcinomu má za následek zvýšenou hladinu proangiogenních faktorů, jako je VEGF, a je také doprovázena zvýšenou hladinou PGE₂. Zásadním regulátorem exprese COX-2 je hypoxie a tedy i HIF-1 α . Zvýšení PGE₂ má pozitivní vliv na přežití nádorových buněk za hypoxických podmínek, stimuluje proliferaci a pohyblivost buněk kolorektálního karcinomu prostřednictvím inhibice apoptózy [44].

2.2.2 Role oxidu dusnatého a NO-syntázy v regulaci patofyziologické angiogeneze

Oxid dusnatý je volný radikál, který je produkován NO-syntázou z L-argininu za účasti NADPH a kyslíku a je důležitou intracelulární a intercelulární signální molekulou [46,47]. Uplatňuje se ve fyziologických a patologických procesech a svou důležitou roli hraje také v angiogenezi a hyperpermeabilitě cév [48].

NO-syntáza je známa ve třech izoformách – endoteliální NO-syntáza (eNOS) produkovaná endoteliálními buňkami, indukibilní NO-syntáza (iNOS) často exprimovaná v různých typech nádorových buněk a neuronální NO-syntáza (nNOS). Isoformy eNOS a iNOS jsou spojeny s nádorovým růstem a angiogenezí a jejich efektivita se jeví závislá na aktivitě, distribuci a koncentraci NO [47]. Naopak efekt NO je závislý na aktivitě a typu izoformy NOS [48].

Produkce iNOS je regulována na úrovni transkripce hypoxií, zánětlivými cytokiny a oxidativním stresem. Na rozdíl od konstitutivních forem tohoto enzymu je nezávislá na intracelulární hladině vápníku [49].

Bylo prokázáno, že VEGF stimuluje expresi eNOS a produkci NO, přičemž při dlouhodobém působení VEGF na lidských žilních endoteliálních buňkách (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) vzrůstá hladina eNOS a při krátkodobé stimulaci se zvyšuje produkce NO, mechanismem zahrnujícím tyrozinkinázovou signalizaci [50].

2.3 Inhibice angiogeneze v protinádorové léčbě

2.3.1 Obecné rozdělení dle místa zásahu

Poznání souvislosti mezi metastázováním nádoru a angiogenezí vedlo k myšlence zaměřit se na inhibici zúčastněných faktorů jako na potenciální cíl léčby nádorových onemocnění [51].

Výhodou tohoto přístupu je nižší toxicita inhibitorů angiogeneze ve srovnání s klasickou chemoterapií a také nižší riziko vzniku rezistence [52]. Navíc v kombinaci s klasickou chemoterapií byla prokázána potenciace účinku – monoklonální protilátka proti VEGF, bevacizumab (Avastin®), nejen omezuje novotvorbu cév, ale také snižuje intersticiální tlak v nádoru, čímž je usnadněn průnik cytostatika do nádoru [51].

Vzhledem ke složitosti děje se nabízí hned několik cílů zásahu. Tím nejobecnějším rozdělením je:

1) Použití mimetik přirozených antagonistů angiogeneze

Zástupcem tohoto přístupu je ABT-510. Jedná se o peptid připravený rekombinantní technikou, který je analogem přirozeného antiangiogenního trombospondinu. Blokuje odpovědi na angiogenní podněty, inhibuje aktivitu endoteliálních buněk a indukuje jejich apoptózu [53]. Bylo prokázáno, že ABT-510 zvyšuje přísun klasických cytostatik (cisplatiny, paclitaxelu) do nádoru vaječníku [54].

2) Potlačení účinku proangiogenních faktorů

Potlačení účinku angiogenních faktorů je v současné době používanější než použití mimetik přirozených antagonistů angiogeneze a jeví se dosud účinněji než aplikace mimetik přirozených antagonistů. Lze sledovat na úrovních jednotlivých kroků angiogenního procesu:

a) **Stabilizace bazální membrány** pomocí inhibice matrixmetaloproteináz – enzymů zodpovědných za rozrušování bazální membrány a okolní matrix. Neovastat, purifikovaný extrakt ze žraločích chrupavek, je příkladem látky působící inhibičně na tyto enzymy. Navíc indukuje apoptózu endoteliálních buněk a blokuje receptory pro VEGF na povrchu endoteliálních buněk [55].

b) Schopnost **inhibice proliferace endoteliálních buněk** byla testována u řady látek, které se však většinou pro svou toxicitu v klinické praxi neuplatnily.

c) **Inhibice klíčového stimulatoru angiogeneze**, tedy především signální dráhy VEGF a jeho receptoru (VEGFR). K inhibici této signální dráhy lze přistupovat na třech úrovních, a to blokáci ligandu (VEGF), blokáci vazebné domény receptoru (většinou pomocí

monoklonálních protilátek) nebo blokadí intracelulární tyrozinkinázové domény (nízkomolekulární inhibitory) [56].

Jako možný cíl zásahu se také nabízí inhibice COX-2 a iNOS nízkomolekulárními látkami. Tento způsob inhibice včetně příkladů úspěšných analogů bude podrobněji popsán v kapitole 2.3.3 o inhibitech těchto enzymů.

2.3.2 Monoklonální protilátky jako inhibitory angiogeneze

Mezi úspěšné přístupy inhibice angiogeneze patří blokování biologických účinků proangiogenních látek použitím monoklonálních protilátek.

Nejznámějším zástupcem je **bevacizumab** (Avastin[®]), humanizovaná monoklonální protilátka proti hlavnímu angiogennímu faktoru VEGF. Jeho účinek spočívá ve vazbě na VEGF, čímž znemožní vazbu tohoto faktoru na jeho receptor (VEGFR) lokalizovaný především v membráně endoteliálních buněk. Tím je zabráněno spuštění signální transdukce, která by měla za následek další děje vedoucí k stimulaci angiogeneze [57].

V České republice je tento způsob léčby dostupný od roku 2005. Poprvé byl použit v roce 2004 pro léčbu nemocných s metastazujícím kolorektálním karcinomem. Tím byl potvrzen jeho klinický přínos, stejně jako bezpečnost léčby. Od roku 2007 je Avastin[®] registrován i pro léčbu nemocných s karcinomem prsu, nemalobuněčným plicním karcinomem a karcinomem ledvin a jeho uplatnění v dalších onkologických diagnozách je stále předmětem výzkumu [58].

Cetuximab (Erbix[®]) je dalším příkladem monoklonální protilátky působící jako inhibitor angiogeneze. Není zacílen na ligand, jako je tomu v případě bevacizumabu, ale jeho účinek je zprostředkován vazbou na extracelulární doménu receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Jedná se o kompetitivní inhibici vazby protilátky s epidermálním růstovým faktorem (EGF) a transformujícím růstovým faktorem alfa (TGF- α) na tento receptor, jejímž výsledkem je blokáda fosforylace intracelulární domény a tím znemožnění aktivace kináz. To má za následek inhibici růstu, indukci apoptózy a sníženou produkci matrixmetaloproteináz a VEGF [59].

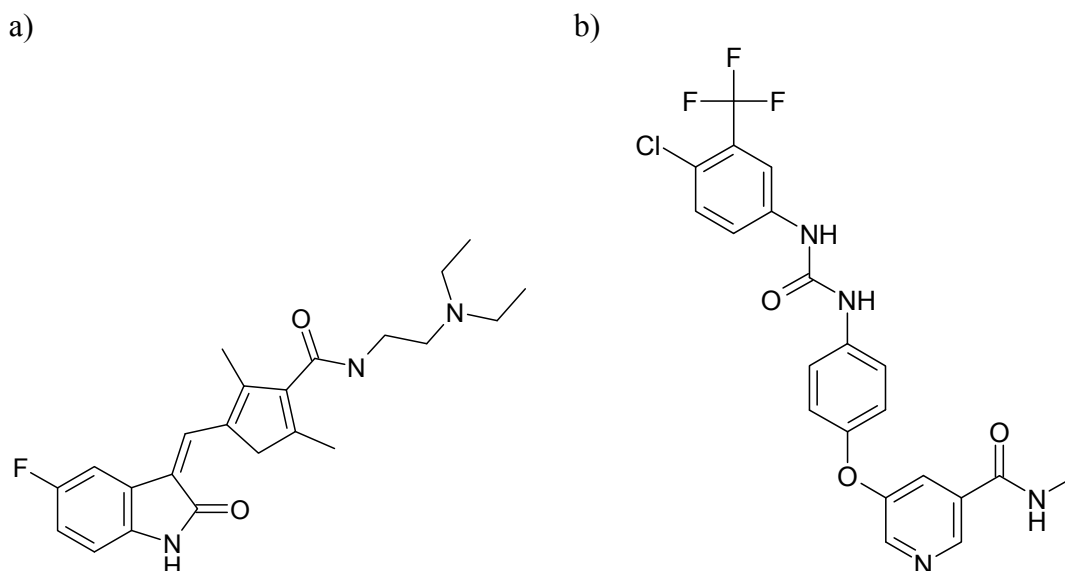
V České republice je tento přípravek dostupný od roku 2005 pro nemocné s metastazujícím kolorektálním karcinomem [59].

2.3.3 Nízkomolekulární inhibitory angiogeneze

- Inhibitory intracelulární tyrozinkinázové domény

Sunitinib (Sutent[®], SU-11248, Obr. 6) je nespecifický inhibitor tyrozinkinázových receptorů především VEGFR a receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGFR) a tedy blokátor navazujících intracelulárních dějů vedoucích ke stimulaci angiogeneze. Kromě toho má doložené *in vitro* a *in vivo* antiproliferační a apoptotické účinky na různé nádorové buňky (malobuněčný karcinom plic, akutní myeloidní leukemie a další) [60,61].

V současné době je v České republice indikován k léčbě metastatického karcinomu ledviny a metastatického maligního gastrointestinálního stromálního tumoru [60].



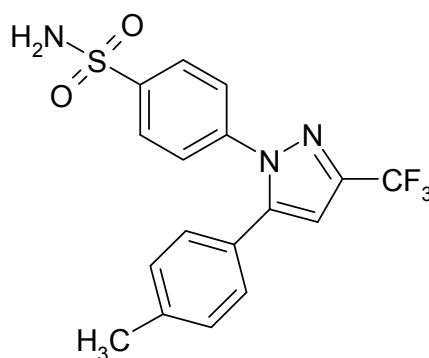
Obr. 6: Struktura sunitinibu (a) a sorafenibu (b)

Dalším klinicky schváleným zástupcem je multikinázový inhibitor **sorafenib** (Nexavar[®], Obr. 6). Působí inhibičně na tyrosinkinázové receptory uplatňující se v proliferaci nádorových buněk a v angiogenezi. Hlavní indikací je pokročilý karcinom ledvin při selhávání či nesnášenlivosti jiného způsobu léčby [62].

- Nesteroidní protizánětlivé léky jako selektivní inhibitory COX-2

U klasických nesteroidních protizánětlivých léků jako je aspirin či ibuprofen byl prokázán inhibiční vliv na tvorbu kapilárních struktur u endoteliálních buněk a na proliferaci u nádorových buněk kolorektálního karcinomu [63,64]. Běžně se podávají pro mírnění bolesti, za kterou jsou zodpovědné prostaglandiny uvolňované jako odpověď na zánět [65]. Tato tzv. první generace nesteroidních protizánětlivých léků inhibuje obě izoformy cyklooxygenáz. Jejich dlouhodobé užívání může mít za následek gastrointestinální obtíže, protože COX-1 je v gastrointestinálním traktu exprimována konstitutivně a má zde ochrannou funkci pro sliznice [66]. Z tohoto důvodu byly hledány látky, které by selektivně inhibovaly pouze indukibilní formu tohoto enzymu (COX-2). Bývají označovány jako nesteroidní protizánětlivé léky druhé generace [67].

Celecoxib (Celebrex[®], Obr. 7) je od roku 1998 klinicky schváleným lékem používaným pro léčbu revmatoidní artritidy a osteoartritidy. Jeho mechanismus účinku spočívá v blokaci tvorby prostaglandinů selektivní inhibicí COX-2 [68], čímž zároveň snižuje riziko vzniku gastrointestinálního krvácení a vzniku vředů. Díky své selektivní inhibici COX-2 může mít však nežádoucí účinky jako je vzrůst krevního tlaku nebo zvýšené riziko vzniku trombózy [69]. Celecoxib je ve II. a III. fázi klinických studií pro prevenci několika druhů rakoviny a v I./II. fázi klinického testování v kombinaci s radioterapií a chemoterapií (fluorouracil a cisplatina) [70].

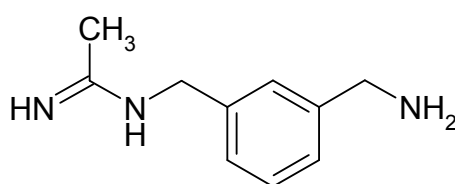


Obr. 7: Struktura celecoxibu.

- Selektivní inhibitory iNOS

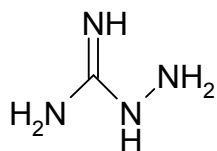
Sloučenina označovaná jako 1400W (Obr. 8) je vysoce selektivním inhibitorem iNOS. Konstitutivní izoformu (eNOS), která je nezbytná pro produkci NO v kardiovaskulárním systému, inhibuje jen velice málo nebo vůbec [71].

Při 6-ti denní kontinuální infúzi (10 nebo 12 mg.kg⁻¹.hod⁻¹) bylo prokázáno snížení hmotnosti nádoru myšího prsního adenokarcinomu *in vivo* a byla také pozorováno zpomalení proliferace lidských nádorových buněk karcinomu tlustého střeva (geneticky upravených pro konstitutivní expresi iNOS) *in vitro* [71].



Obr. 8: Struktura 1400W

Dalším příkladem selektivního inhibitoru iNOS je aminoguanidin (Obr. 9). Látka, u které bylo pozorováno snížení proliferace a indukce apoptózy buněčné linie rakoviny žaludku MFC *in vitro*. Dále byla sledována schopnost této látky snížit velikost a hmotnost nádoru karcinomu žaludku *in vivo* [72].

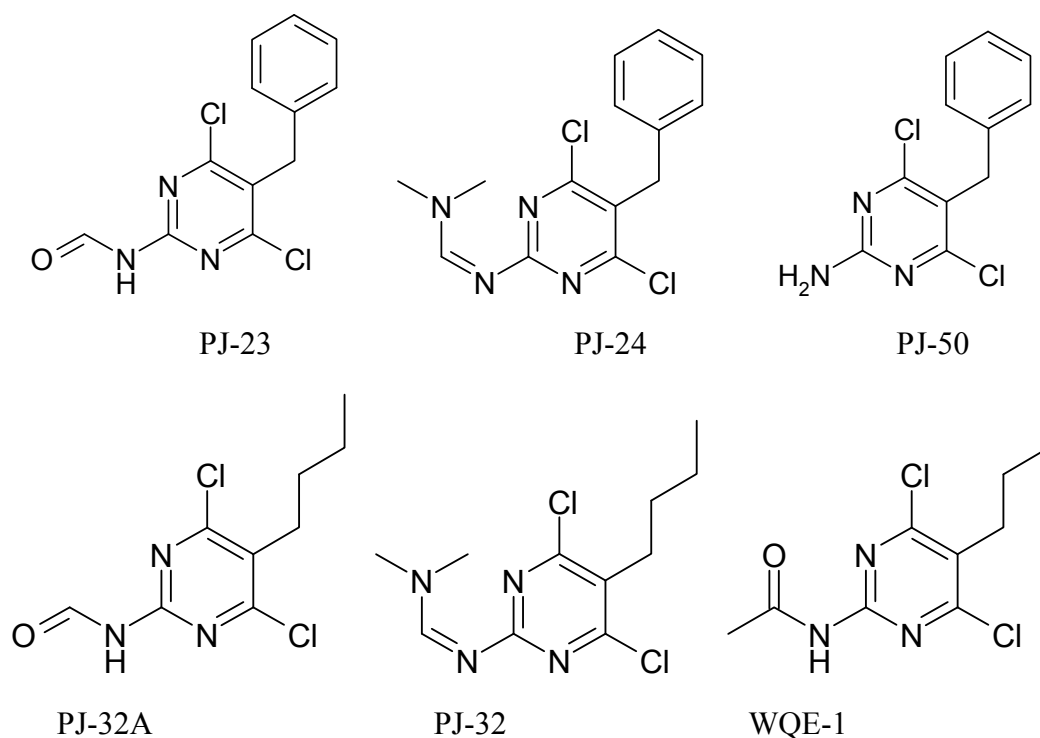


Obr. 9: Struktura aminoguanidinu

Obě uvedené sloučeniny nejsou v žádné fázi klinického testování, jedná se o sloučeniny biologicky aktivní a využívané pouze jako nástroj studie v laboratořích.

2.4 Studované 4,6-dichloropyrimidinové deriváty

Studované 4,6-dichloropyrimidinové deriváty byly syntetizovány Dr. Jansou a Dr. Kolmanem na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Jedná se o nově připravené sloučeniny (Obr. 10), meziprodukty syntézy diaminohydroxypyrimidinů (tzv. open-ring acyklických nukleosid fosfonátů s antivirovou aktivitou). U těchto meziproduktů byla zjištěna významná inhibice tvorby NO (Dr. Jansa, Dr. Zídek - nepublikované výsledky). Látky byly proto dále testovány, zda inhibují také tvorbu COX-2. Tato inhibice byla potvrzena a následně byl zjištěn i vliv na produkci VEGF (Dr. Zídek – nepublikované výsledky). Tyto výsledky byly podnětem pro hlubší prozkoumání těchto analogů z hlediska vlivu na jednotlivé kroky angiogeneze (proliferaci, migraci a diferenciaci), indukci apoptózy a distribuci buněčného cyklu HUVEC. Dále byly u studovaných látek zkoumány účinky na buněčnou proliferaci a distribuci buněčného cyklu lidských leukemických buněk CCRF CEM.

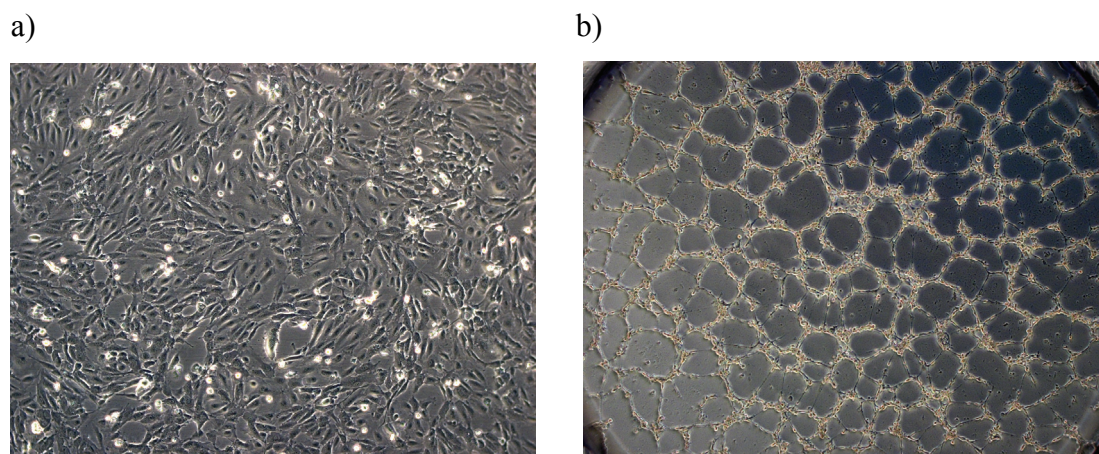


Obr. 10: Struktury studovaných 4,6 – dichloropyrimidinových derivátů.

2.5 Použité *in vitro* metody studia potenciálních inhibitorů angiogeneze

2.5.1 „Capillary-like tube formation test“

„Capillary-like tube formation test“ (dále jen „tube formation assay“) je metoda, která využívá schopnosti endoteliálních buněk diferenciovat v prostředí extracelulární matrix a tím tvořit kapilární struktury (Obr. 11). Těto diferenciaci předchází adheze a migrace endoteliálních buněk a sekrece proteáz. Metoda v sobě tedy zahrnuje hned několik kroků uplatňujících se v angiogenezi, a proto je jednou z nejpoužívanějších *in vitro* metod pro průkaz antiangiogenních, popřípadě proangiogenních účinků sloučenin. Za diferenciaci endotelií je zodpovědné složení extracelulární matrix bazální membrány, vzájemná komunikace buněk a interakce buňka-matrix [73].

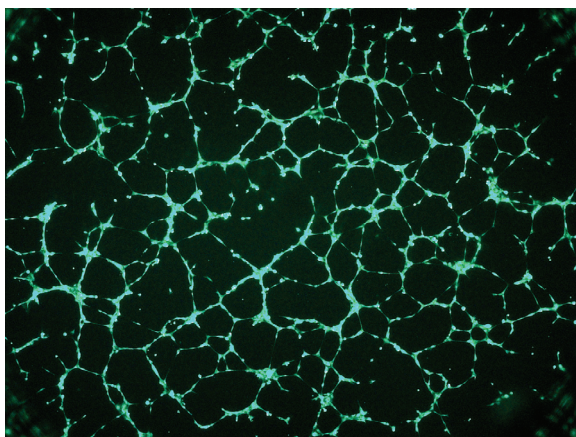


Obr. 11: Endoteliální buňky na kolagenu (a) a diferenciované endoteliální buňky na MatrigeluTM (b), 25x zvětšeno.

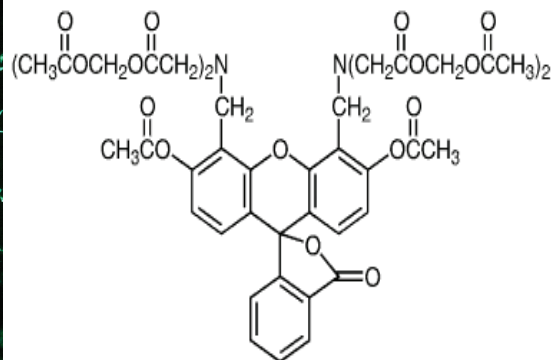
Jako model extracelulární matrix byl použit MatrigelTM. MatrigelTM je biologický extrakt získaný z Englebreth-Holm-Swarm myšího sarkomu a obsahuje všechny důležité komponenty bazální membrány [74]. Hlavními složkami jsou laminin, entaktin, kolagen IV a heparan sulfát proteoglykany, které interagují s endoteliálními buňkami a umožňují jejich migraci a diferenciaci.

Vzniklé kapilární struktury se pro lepší vizualizaci mohou označit calceinem AM (Obr. 12, str. 17), což je nefluorescenční acetoxymethyl ester calceinu. calcein AM proniká membránou buněk, kde je hydrolyzován endogenními esterázami na záporně nabitý zeleně fluoreskující calcein, který díky svému náboji zůstává v buňce [75].

a)



b)



Obr. 12: Endoteliálními buňkami utvořené tubulární struktury na Matrigelu™ vizualizované calceinem AM, 25x zvětšeno (a), struktura calceinu AM, převzato z [76], (b).

2.5.2 „Wound healing assay“

Proces hojení ran je uskutečňován mimo jiné pomocí angiogeneze a důležitou roli v něm hraje migrace buněk. Touto skutečností se inspirovala metoda zvaná „Wound healing assay“, pomocí které je možné sledovat migraci buněk *in vitro* a která mimikuje buněčnou migraci během angiogenního procesu *in vivo* [77].

Jedná se o jednoduchou a levnou metodu, jejíž princip spočívá ve vytvoření rýhy do jedné vrstvy buněk (Obr. 13) a následném sledování jejich migrace a zacelování rýhy v závislosti na čase.

Lze tak studovat vliv látek jak na regulaci migrace, které se účastní extracelulární matrix i rozpustné faktory, tak jejich vliv na intercelulární interakce, které jsou pro migraci nezbytné.

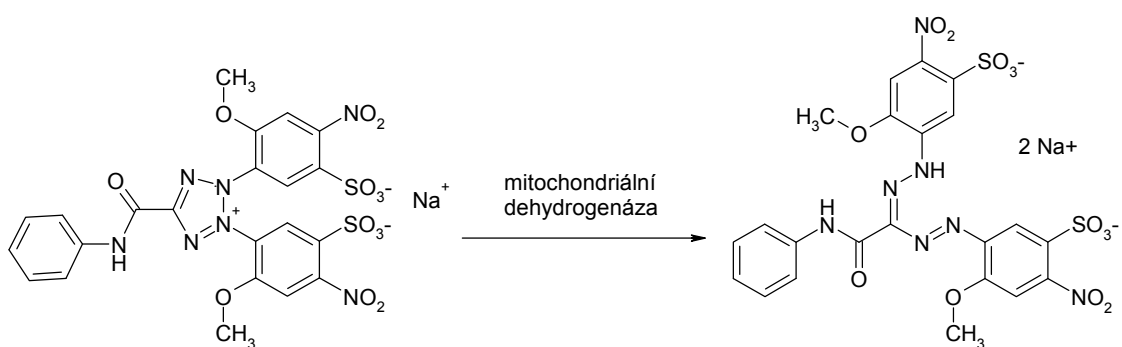


Obr. 13: Rýha v jedné vrstvě endoteliálních buněk přisedlých na kolagenu, 25x zvětšeno.

2.6 Sledování biologických účinků testovaných látek

2.6.1 Stanovení vlivu 4,6-dichloropyrimidinových derivátů na buněčnou proliferaci u HUVEC a CCRF CEM

Stanovení je založeno na přeměně žluté tetrazoliové soli (XTT) na oranžový formazan působením mitochondriální dehydrogenázy u metabolicky aktivních buněk (Obr. 14). Intenzita oranžového zbarvení je měřena spektrofotometricky a je přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk [78]. Jedná se o metodu hojně využívanou pro stanovení vlivu látek na buněčnou proliferaci a pro stanovení cytotoxicity sloučenin.



Obr. 14: Přeměna žluté tetrazoliové soli na oranžový formazan pomocí mitochondriální dehydrogenázy, převzato z [78].

2.6.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda pro analýzu různých charakteristik jediné buňky. Umožňuje analýzu velikosti buněk, jejich cytoplazmatické integrity, syntézy DNA, RNA, lze ji využít k imunofenotypizaci či sortování buněk a k mnoha dalším buněčným analýzám [79].

V této práci byla průtoková cytometrie využita pro sledování schopnosti studovaných 4,6-dichloropyrimidinových derivátů indukovat apoptózu HUVEC a jejich vlivu na distribuci buněčného cyklu HUVEC a CCRF CEM.

- **Detekce apoptózy u buněčné linie HUVEC**

Apoptóza, neboli řízená buněčná smrt, je fyziologický proces, pomocí něhož jsou odstraňovány staré, nefunkční či poškozené buňky. Svou důležitou roli hraje apoptóza ve vývoji embrya – klasickým příkladem embryonální apoptózy je např. vývoj prstů plodu [80].

Průvodním znakem časně fáze apoptózy buněk je ztráta asymetrie membránových fosfolipidů. Dochází k translokaci fosfatidylserinu, u zdravých buněk lokalizovaného na vnitřní straně buněčné membrány, na její vnější stranu [81].

Při stanovení apoptózy se využívá schopnosti fluorescenčně značeného annexinu V, nejčastěji fluorescein isothiokyanátem (FITC), vázat se specificky za přítomnosti vápníku na fosfatidylserin na vnější straně membrány apoptotických buněk. Detekce pozdně apoptotických buněk je umožněna současným přidáním propidium jodidu (PI), který proniká do jádra, váže se na DNA a tím se zvyšuje jeho fluorescence. Pozdně apoptotické buňky, narozdíl od zdravých a časně apoptotických, mají porušenou integritu cytoplazmatické membrány, a proto nedokáží PI vypudit [81].

Analýza na průtokovém cytometru zajistí rozdělení buněk na tři populace – zdravé, ranně apoptotické a pozdně apoptotické (+ debris). Toto rozdělení je ve většině případů dostačující pro posouzení schopnosti testovaných látek vyvolat apoptózu [81].

• **Sledování vlivu studovaných látek na distribuci buněčného cyklu HUVEC a CCRF CEM**

Mezi dvěma děleními prochází buňka sledem událostí, který se nazývá buněčný cyklus. Je rozdělen do čtyř fází - G1, S, G2 a M fáze. V G1 fázi dochází ke zdvojování buněčné hmoty, růstu buňky a k tvorbě RNA a proteinů. V G1 fázi je také důležitý kontrolní bod, ve kterém se rozhoduje, zda buňka vstoupí do S fáze a bude se dělit nebo zda vstoupí do klidové fáze (G0). V S fázi probíhá replikace DNA. V G2 fázi dochází ke zdvojování organel a k syntéze dělicího aparátu – mitotického vřeténka. V G2 fázi je také důležitý kontrolní bod, ve kterém se rozhoduje, zda buňka postoupí do M fáze, tedy do fáze samotného buněčného dělení [80].

Fáze buněčného cyklu se od sebe liší obsahem DNA, kdy v G1 fázi obsah DNA odpovídá jedné buňce a v G2/M fázi odpovídá obsah DNA buňkám dvěma. Metoda, která pomocí průtokové cytometrie analyzuje distribuci buněčného cyklu, je založena na označení DNA vhodnou fluorescenční značkou, v tomto případě propidium jodid (PI). Aby se zamezilo vypuzení PI zdravými buňkami, je nutné jejich membránu permeabilizovat přidavkem ethanolu [82].

3 Experimentální část

3.1 Přístroje, materiál a použité chemikálie

Centrifuga, Eppendorf 5810 R, Německo

Cytometr, BD LSR Fortessa, USA

Čtečka mikrotitračních destiček, Sunrise, Tecan, Rakousko

Flow box, Clean Air, Telstar, Španělsko

Fluorescenční mikroskop, AxioObserve A1, Zeiss, Německo

Inkubátor, SANYO, Japonsko

Počítač buněk, Countessautomated cell counter, Invitrogen, USA

Vodní lázeň, TN 20, Julabo, Německo

Automatické pipety (100-1000 μ l, 20-200 μ l, 20-100 μ l, 1-10 μ l, 0,1-1 μ l), Nichipet EX

Centrifugační zkumavky (15 ml, 50 ml), TPP

Destičky potažené kolagenem I (6 jamek), BD Biosciences

Mikrotitrační destičky potažené kolagenem I (6 jamek), BD Biosciences

Mikrotitrační destičky (96 jamek), TPP

Mikrozkumavky, Axygen

Petriho misky (6 cm), BD Biosciences

Pipetman, Swiftpet

Plastové kultivační lahve (25 cm², 75 cm²), TPP

Plastové pipety (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), TPP

Počítací komůrka, Invitrogen

Špičky (100-1000 μ l, 10-200 μ l, 1-10 μ l), Neptune

„ μ -slide“ destičky, IBIDI

Calcein AM roztok, 4 mg/ml, $\geq 90\%$, Sigma

Dimethylsulfoxid (DMSO), $\geq 99,7\%$, Sigma

Fetální bovinní sérum, Sigma

Fosfátový pufr (PBS), Sigma

Glutamax, Gibco, Invitrogen

Kit pro stanovení apoptózy (AlexaFluor[®] 488 AnnexinV Dead Cell Apoptosis Kit),
Invitrogen
Kit pro stanovení buněčné proliferace, Cell proliferation kit II (XTT), Roche
Lidské endoteliální buňky (HUVEC), BD Biosciences
Lidské leukemické buňky (CCRF CEM), ATCC
Matrigel[™], BD Biosciences
Medium E-STIM, Endothelial Cell Culture Medium Kit, BD Biosciences
Medium M200, Gibco
Medium RPMI 1640, Sigma
Propidium jodid, ≥94%, Sigma
Ribonukleáza A, 70 jednotek/mg proteinu, Sigma
Směs antibiotik penicilin (10 000 jednotek) a streptomycin (10 mg/ml), Sigma
Staurosporin, ≥95%, Sigma
Sulforafan, ≥95% Sigma
Triton X, 1,07 mg/ml, Sigma
0,25 % Trypsin-EDTA 0,05% roztok, Sigma

3.2 Kultivace buněčné linie HUVEC

HUVEC je přisedle roustoucí buněčná linie, která byla kultivována na Petriho miskách s kolagenovým povrchem. Kultivační médium (E-STIM) je optimalizované pro kultivaci lidských endoteliálních buněk. Obsahuje hydrokortison, heparin a fetální bovinní sérum. Před použitím bylo navíc obohaceno o 5 µg epidermálního růstového faktoru a 100 mg směsi růstových faktorů pro endoteliální buňky na objem media 500 ml. Vzniklé kompletní médium bylo následně použito pro přípravu roztoků inhibitoru trypsinu rozpuštěním 50 mg Soybean trypsin inhibitoru v 50 ml kompletního media. Roztoky inhibitoru trypsinu byly před použitím uchovány při -20 °C.

Buněčná linie se tzv. „pasáže“ po dosažení zhruba 80 % konfluence. Předpokladem je uvolnění buněk z kultivačního povrchu. Buňky byly uvolňovány pomocí proteázy trypsinu, který rozrušuje mezibuněčné kontakty a kontakty mezi buňkami a kultivačním povrchem. Trypsin je nutné ihned po uvolnění buněk inaktivovat, aby nedošlo k poškození buněčné membrány. Kultivace byla prováděna v termostabilním inkubátoru (37 °C) v atmosféře syčené 5 % oxidu uhličitého. Pro účely experimentů byly použity buňky z maximálně osmé pasáže.

Postup kultivace :

- Odsání media, oplach 2 ml roztoku trypsinu v ethylendiaminotetraoctové kyselině (0,25% trypsin v 0,05 % EDTA)
- Napipetování 2 ml trypsin-EDTA
- Inaktivace trypsin-EDTA inhibitorem trypsinu (2 x 3 ml)
- Přepipetování buněčné suspenze do centrifugační zkumavky
- Centrifugace (7 min, 180 x g)
- Odstranění supernatantu, resuspendování sedimentu v kultivačním médiu
- Stanovení koncentrace buněk v 1 ml buněčné suspenze
- Přenesení potřebného množství buněčné suspenze do čerstvého E-STIM media

3.3 Kultivace buněčné linie CCRF CEM

Buněčná linie lidské akutní lymfoblastické leukémie (CCRF CEM) byla zvolena pro biologické testy pro svou schopnost rychle se dělit ve srovnání s buněčnou linií HUVEC. Jedná se o suspenzní buněčnou linii, která byla kultivována v plastových kultivačních lahvích v kultivačním médiu RPMI 1640. 500 ml kultivačního media bylo před použitím

obohaceno o 5 ml směsi antibiotik penicilin (10 000 jednotek)/streptomycin (10 mg/ml), 5 ml glutamaxu (L-glutamin se sníženou degradací) a o 10 % (v/v) fetálního bovinního séra.

Postup kultivace:

- Odběr a stanovení koncentrace buněk v 1 ml buněčné suspenze
- Přidání předem vypočteného objemu buněčné suspenze do čerstvého kultivačního media RPMI 1640 v plastových kultivačních lahvích

3.4 Stanovení vlivu 4,6-dichloropyrimidinových derivátů na buněčnou proliferaci pomocí XTT testu

Testování vlivu studovaných látek na buněčnou proliferaci bylo provedeno na suspenzní leukemické buněčné linii CCRF CEM a na přisedlých nenádorových buňkách HUVEC pomocí „Cell proliferation kit II (XTT)“.

Postup stanovení:

- Odběr a počítání buněk (v případě přisedlé linie nutnost uvolnění buněk pomocí trypsin-EDTA – viz. kapitola 3.2)
- Příprava buněčné suspenze o koncentraci 150 000 buněk na 1 ml (odpovídá 13 500 buněk na 1 jamku) v případě CCRF CEM a koncentraci 34 000 buněk na 1 ml (odpovídá 3 000 buněk na 1 jamku) v případě HUVEC
- Pipetování 90 µl buněčné suspenze do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček (HUVEC pipetovány do jamek potažených kolagenem)
- 24 hodin inkubace (37 °C, 5 % CO₂)
- Přidání 1 µl studovaných sloučenin o koncentraci 10 a 25 mmol/l (výsledná koncentrace studovaných látek v buněčné suspenzi 10 a 25 µmol/l, v případě kontroly byl přidán 1 µl DMSO (u HUVEC bylo médium odsáto a studované sloučeniny byly přidány v čerstvém kultivačním mediu, 100 µl na 1 jamku)
- 72 hodin inkubace (37 °C, 5 % CO₂)
- Příprava pracovního roztoku XTT: XTT označovací činidlo 1 mg/ml a elektron vázající činidlo 0,383 mg/ml smíchány v poměru 50 : 1
- Měření absorbance na čtečce mikrotitračních destiček (spektrofotometr Tecan) při vlnové délce 490 nm a referenční vlnové délce 650 nm v programu Magellan (verze 6.3)
- Export a zpracování dat v MS Excel

3.5 „Tube Formation Assay“

V této metodě byla použita buněčná linie HUVEC.

- Pomalé rozmrazení MatrigeluTM na ledu v lednici, vychlazení špiček a „μ-slide“ destiček
- Pipetování 10 μl MatrigeluTM na ledu do jednotlivých jamek destičky
- Tuhnutí MatrigeluTM (37 °C, 5 % CO₂, 30 min)
- Uvolnění HUVEC z kolagenem potažených kultivačních misek pomocí trypsinu-EDTA, počítání buněk, příprava buněčné suspenze o koncentraci 140 000 buněk na 1 ml (odpovídá 7 000 buněk na 1 jamku)
- Rozpipetování buněčné suspenze do mikrozkušavek po 1 ml
- Přidání 1 μl roztoků studovaných sloučenin o koncentraci 10 a 25 mmol/l (výsledná koncentrace studovaných látek v buněčné suspenzi 10 a 25 μmol/l, v případě kontroly byl přidán 1 μl DMSO a v případě pozitivní kontroly byl přidán sulforaphan [83] o výsledné koncentraci 10 μmol/l)
- Pipetování 50 μl buněčné suspenze s přidávanými studovanými látkami do každé jamky
- 6 hodin inkubace (37 °C, 5 % CO₂)
- Po odsání media z každé jamky přidáno 50 μl připraveného roztoku calceinu AM o koncentraci 5 μg/ml.
- 30 minut inkubace (37 °C, 5 % CO₂)
- Focení každé jamky fluorescenčním mikroskopem AxioObserve A1 s nainstalovanou kamerou v programu AxioVision Release 4.7.2., 25x zvětšení

3.6 Wound Healing Assay

- Uvolnění HUVEC z kolagenového povrchu kultivační misky trypsinem-EDTA, počítání buněk a příprava buněčné suspenze o koncentraci 200 000 buněk na 1 ml
- Pipetování 1 ml připravené buněčné suspenze do jamek 6-ti jamkové destičky potažené kolagenem
- Nárůst buněk do 100% konfluence
- Vytvoření rýhy do vrstvy konfluentních buněk, odstranění uvolněných buněk a oplach jamek médiem M200 neobsahujícím sérum a růstové faktory

- Pipetování 1 ml kultivačního média s 1 μ l roztoku 25 mM látky rozpuštěné v DMSO, výsledná koncentrace látek činila 25 μ mol/l (v případě kontroly byl do 1 ml kultivačního média přidán 1 μ l DMSO)
- Focení vytvořených rýh ihned po napipetování látek pomocí mikroskopu s nainstalovanou kamerou, 25x zvětšení v čase $t = 0$
- 6 hodin inkubace, odsátí média, napipetování 1 ml čerstvého kultivačního média bez testovaných látek
- Focení vytvořených rýh v časech $t = 6, 8, 10$ a 12 hodin
- Kvantifikace v programu ImageJ (verze 1.43u)
- Zpracování dat v MS Excel

3.7 Sledování schopnosti studovaných látek indukovat apoptózu u HUVEC buněk

Pro stanovení schopnosti studovaných látek indukovat apoptózu byl použit AlexaFluor[®] 488 AnnexinV Dead Cell Apoptosis Kit, který obsahoval: 10 x koncentrovaný vazebný pufr (před použitím nutno naředit na 1 x koncentrovaný), propidium jodid o koncentraci 100 μ g/ml a annexin V o neznámé koncentraci.

- Uvolnění HUVEC z kolagenového povrchu kultivační misky trypsinem-EDTA, počítání buněk a příprava buněčné suspenze o koncentraci 150 000 buněk na 1 ml
- Pipetování 1 ml připravené buněčné suspenze do jamek 6-ti jamkové destičky potažených kolagenem
- Po 24 hodinové inkubaci odsátí kultivačního média, oplach 1 ml teplého (37 °C) média M200
- Pipetování 1 ml nového kultivačního média s přidávanými roztoky studovaných látek o výsledných koncentracích 10 μ mol/l a 25 μ mol/l (v případě kontroly byl přidán DMSO tak, aby jeho obsah odpovídal obsahu DMSO ve vzorkách, jako pozitivní kontrola byl použit 5 μ M staurosporin [84])
- Po 6-ti hodinové inkubaci přenesení média do předem označených centrifugačních zkumavek.
- Oplach jamek 2 ml teplého (37 °C) M200 a přenesení do příslušných zkumavek
- Uvolnění buněk z kolagenového povrchu v 0,5 ml trypsinu-EDTA

- Po uvolnění buněk inaktivace trypsinu-EDTA 0,5 ml fetálního bovinního séra (FBS)
- Přenesení obsahu jamek do příslušných centrifugačních zkumavek
- Centrifugace 5 min, 250 x g, laboratorní teplota
- Odsávání supernatantu, promytí 1 ml studeného (3 °C) fosfátového pufru (PBS)
- Centrifugace 5 min, 250 x g, 3 °C
- Odsání supernatantu na ledu, resuspendování pelety ve 100 µl pracovního roztoku (na 100 µl vazebného pufru: 1 µl PI a 5 µl annexinu V)
- 15 min inkubace v temnu za laboratorní teploty
- Přídavek 400 µl vazebného pufru do každé zkumavky
- Analýza na průtokovém cytometru v programu BD FACSDiva (verze 6.2) a zpracování dat v MS Excel

3.8 Sledování vlivu studovaných látek na distribuci buněčného cyklu CCRF CEM a HUVEC

- Odběr a stanovení koncentrace buněk v 1 ml (v případě přisedlé linie nutnost uvolnění buněk pomocí trypsin-EDTA – viz. kapitola 3.2)
- Příprava buněčných suspenzí dle následující tabulky (Tab. 3,)

Tab.3: Různé koncentrace připravovaných buněčných suspenzí lišící se v závislosti na době inkubace se studovanými látkami a na druhu buněčné linie.

	1 den inkubace	3 dny inkubace
HUVEC	100 000 buněk na jamku	50 000 buněk na jamku
CCRF CEM	300 000 buněk na 1 ml	100 000 buněk na 1 ml

- Pipetování 3 ml připravené buněčné suspenze do jamek 6-ti jamkových destiček (v případě HUVEC destičky potažené kolagenem)
- 24 hodin inkubace (37 °C, 5 % CO₂)
- Přidání 3 µl roztoků studovaných sloučenin o koncentraci 25 mmol/l (výsledná koncentrace studovaných látek v buněčné suspenzi 25 µmol/l, v případě kontroly byly přidány 3 µl DMSO)
- Inkubace 24 hodin nebo 72 hodin (37 °C, 5 % CO₂)
- Převedení buněčné suspenze do předem označených centrifugačních zkumavek
- Centrifugace (5 min, 250 x g, laboratorní teplota)

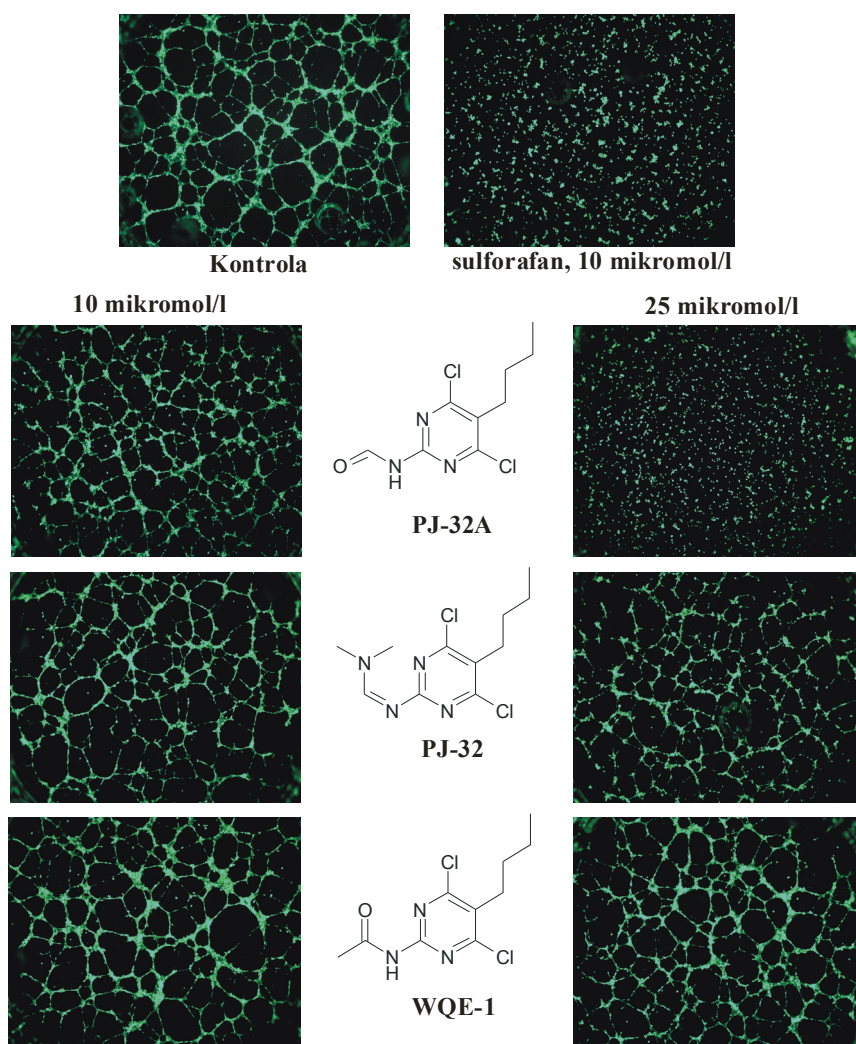
- Slití supernatantu a na ledu resuspendování pelety v 5 ml vychlazeného (4 °C) fosfátového pufru (PBS)
- Centrifugace (5 min, 250 x g, 4 °C)
- Slití supernatantu a na ledu resuspendování buněčné pelety v 500 µl PBS
- Přidání 4,5 ml 80 % (v/v) ethanolu za neustálého míchání
- Inkubace 30 min na ledu
- Centrifugace (5 min, 250 x g, 4 °C)
- Odsání supernatantu a resuspendování pelety v 1 ml studeného (4 °C) PBS
- Centrifugace (5 min, 250 x g, laboratorní teploty)
- Příprava pracovního roztoku I: na 500 µl PBS přídavek 3 µl PI (20 mg/ml) a 30 µl 2% Tritonu X
- Příprava pracovního roztoku II: na 500 µl PBS přídavek 30 µl ribonukleázy A (70 jednotek/mg proteinu)
- Odsání supernatantu a resuspendování pelety v 500 µl připraveného pracovního roztoku
- Inkubace 1,5 hodiny, 37 °C, ve tmě
- Analýza na průtokovém cytometru v programu BD FACSDiva (verze 6.2)
- Zpracování naměřených hodnot v programu ModFit LT 3.0
- Statistické zpracování dat a tvorba grafů v MS Excel

4 Výsledky a diskuze

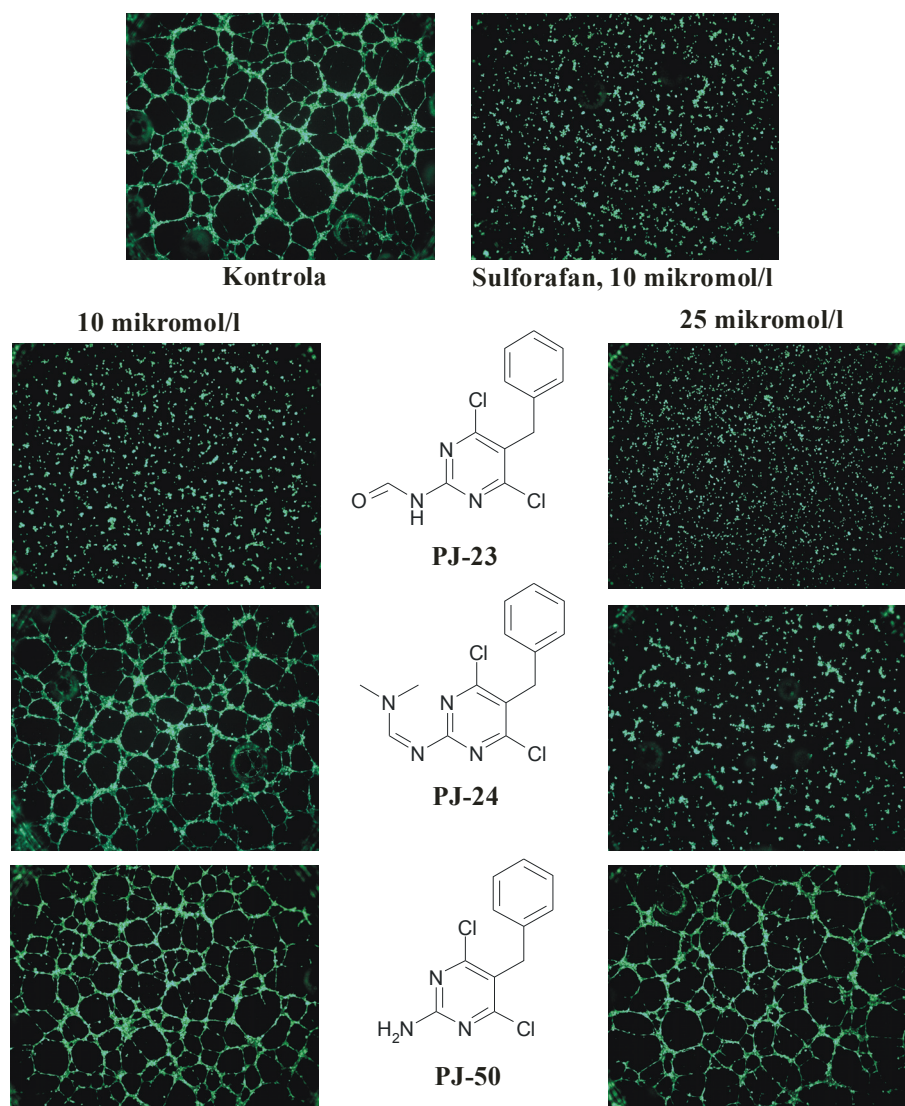
4.1 „Tube formation assay“

Pro sledování schopnosti studovaných 4,6-dichloropyrimidinových derivátů potlačit tvorbu tubulárních struktur endoteliálními buňkami HUVEC byla použita tzv. „tube formation assay“.

Po vysetí buněk na ztuhlý Matrigel™ byly buňky 6 hodin ovlivňovány studovanými sloučeninami. Jako pozitivní kontrola byl použit sulforaphan, přírodní izothiokyanát s prokázanými antiangiogenními účinky v „tube formation assay“ [83]. Po této inkubaci byly buňky označeny calceinem AM a foceny fluorescenčním mikroskopem (Obr. 15,16). Stanovení bylo provedeno třikrát v triplicátech.



Obr. 15: Reprezentativní obrázky účinků PJ-32A, PJ-32 a WQE-1 na tvorbu tubulárních struktur endoteliálními buňkami HUVEC po 6-ti hodinové inkubaci. Kontrola= neovlivněné buňky. Sulforaphan= pozitivní kontrola. Vizualizace pomocí calceinu AM, foceno fluorescenčním mikroskopem Zeiss AxioObserve A1, 25 x zvětšeno



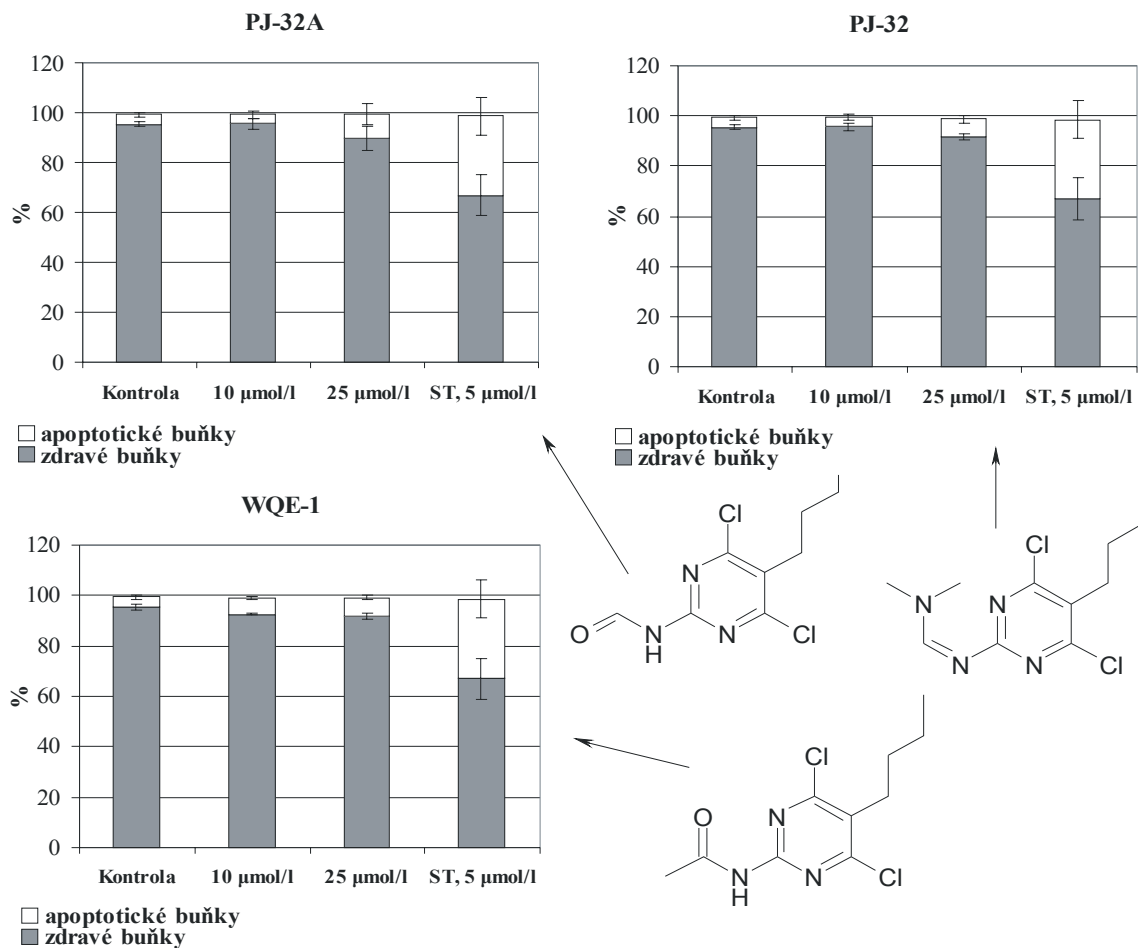
Obr. 16: Reprezentativní obrázky účinku PJ-23, PJ-24 a PJ-50 na tvorbu tubulárních struktur endoteliálními buňkami HUVEC po 6-ti hodinové inkubaci. Kontrola= neovlivněné buňky. Sulforaphan= pozitivní kontrola. Vizualizace pomocí calceinu AM, foceno fluorescenčním mikroskopem Zeiss AxioObserve A1, 25x zvětšeno.

Tvorba tubulárních struktur HUVEC byla zcela potlačena látkami PJ-23 již při 10 μ M koncentraci, PJ-24 a PJ-32A při 25 μ M koncentraci. Jisté procento snížení tvorby tubulárních struktur bylo pozorováno u 25 μ M PJ-32.

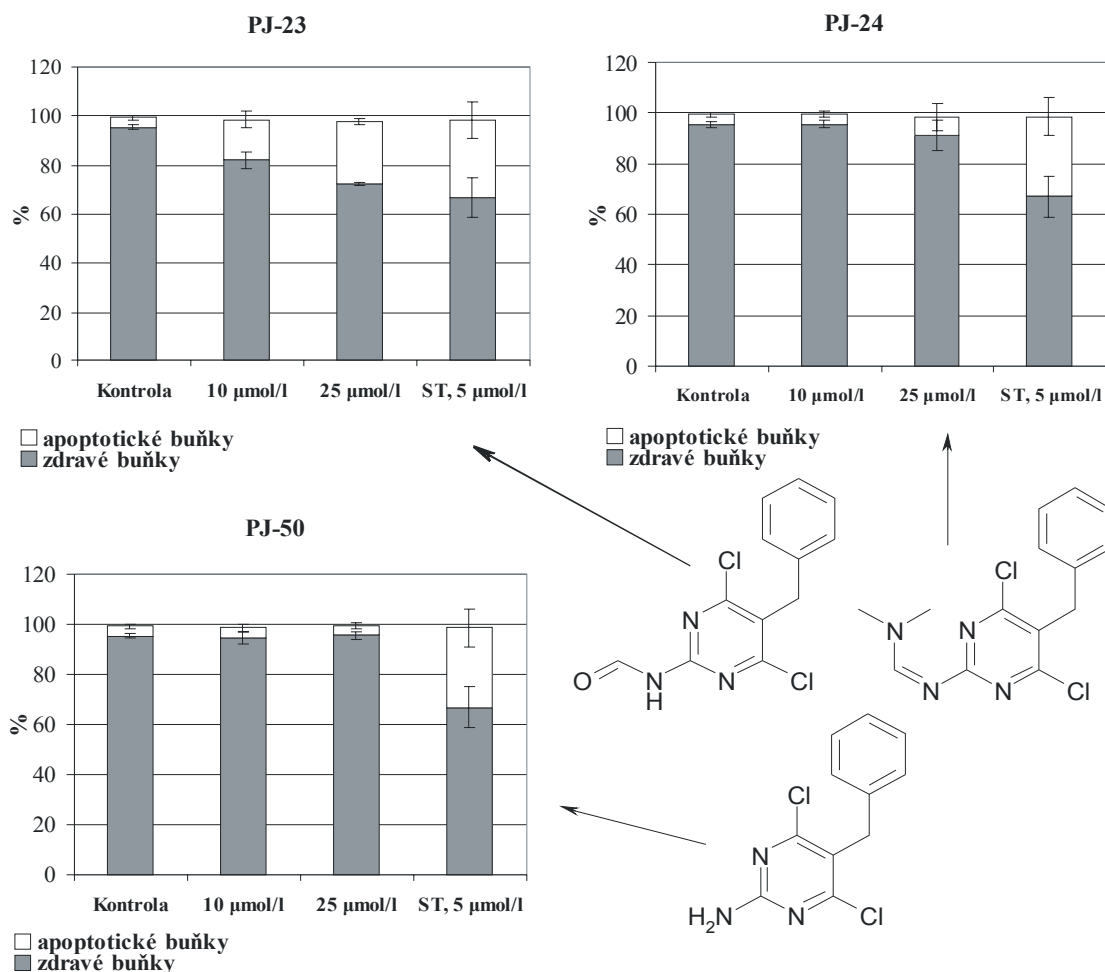
4.2 Vliv studovaných látek na indukci apoptózy u HUVEC

Vliv studovaných látek na indukci apoptózy u endoteliálních buněk byl stanovován pro zjištění, zda pozorovaný inhibiční účinek PJ-23, PJ-24, PJ-32A a PJ-32 na tvorbu tubulárních struktur endoteliálních buněk není způsoben indukci apoptózy u buněčné linie HUVEC.

Buňky vystaveny působení 10 μM a 25 μM látek po dobu 6 hodin. Procentuální zastoupení apoptotických a zdravých buněk bylo určeno pomocí průtokového cytometru za použití duálního značení annexinem V-FITC a PI („AlexaFluor® 488 AnnexinV Dead Cell Apoptosis Kit“). Naměřená data byla statisticky zpracována a byly z nich vyhotoveny grafy v programu MS Excel (Obr. 17,18).



Obr. 17: Vliv PJ-32A, PJ-32 a WQE-1 na indukci apoptózy po 6-ti hodinové inkubaci u buněčné linie HUVEC. Kontrola= neovlivněné buňky, ST= staurosporin, pozitivní kontrola



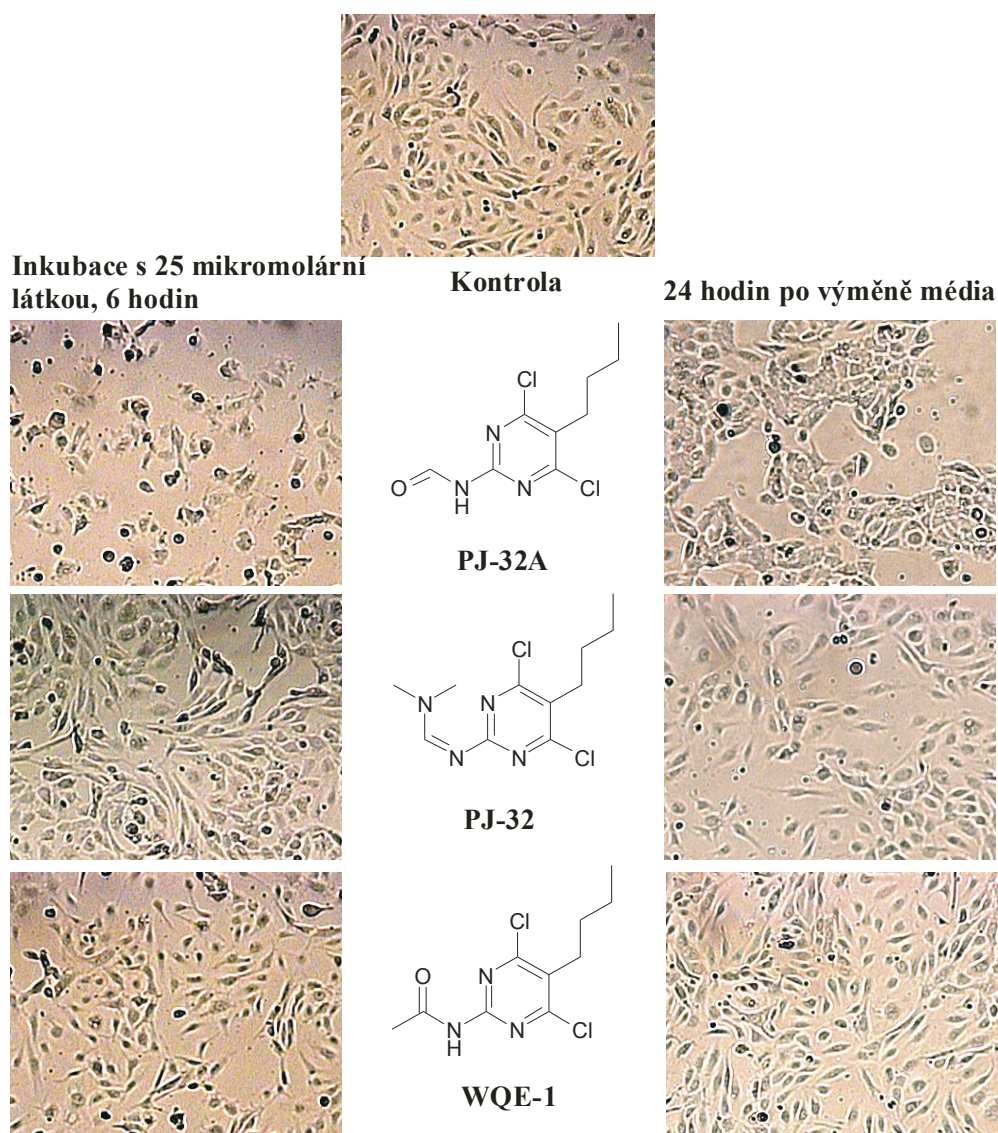
Obr. 18: Vliv PJ-23, PJ-24 a PJ-50 na indukci apoptózy po 6-ti hodinové inkubaci u buněčné linie HUVEC. Kontrola= neovlivněné buňky, ST= staurosporin, pozitivní kontrola

Nejsilnějším induktorem apoptózy ze šesti studovaných sloučenin je látka PJ-23. Po 6-ti hodinové inkubaci HUVEC s 25 μM PJ-23 bylo v analyzované buněčné suspenzi přítomno více než 20 % apoptotických buněk a po inkubaci s 10 μM PJ-23 bylo přítomno více než 15 % apoptotických buněk. V případě PJ-23 může pozorovaný antiangiogenní účinek v „tube formation assay“ souviset se schopností této látky vyvolat apoptózu u endoteliálních buněk. U zbylých tří látek (PJ-24, PJ-32A a PJ-32) pozorovaný efekt na tvorbu tubulárních struktur zřejmě nebude způsoben vyvoláním apoptózy u HUVEC buněk. Podíl apoptotických buněk po 6-ti hodinovém působení těchto látek nepřesahoval 8 % při nejvyšší testované koncentraci (25 $\mu\text{mol/l}$).

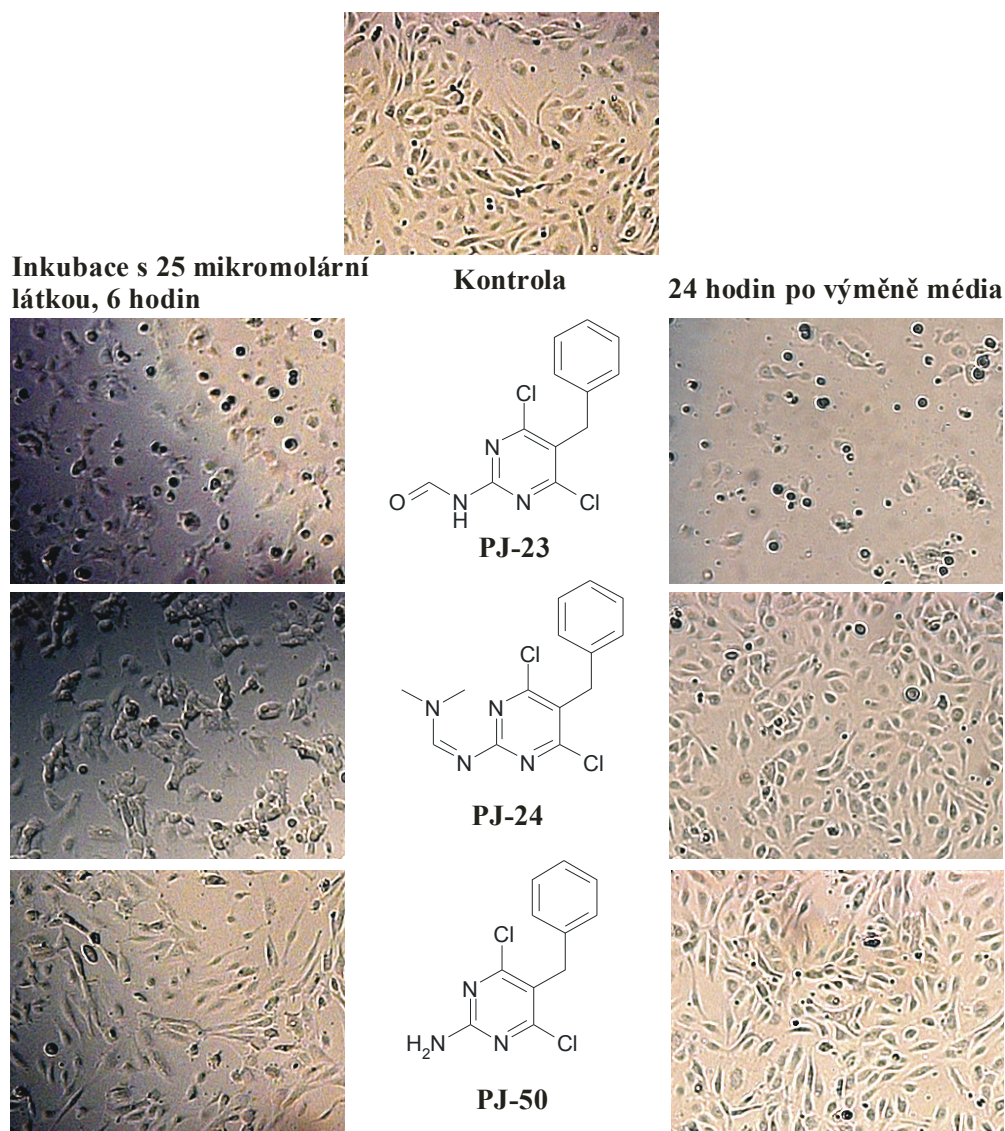
Použitá pozitivní kontrola staurosporin indukuje apoptózu endoteliálních a jiných adhezních buněk prostřednictvím znemožnění mezibuněčných kontaktů a kontaktů mezi buňkou a matrix. Staurosporin zabráňuje fosforylaci fokální adhezní kinázy, která je nezbytnou součástí fokálního adhezního multikomplexu umožňujícího adhezi, přežití a migraci endoteliálních buněk [84].

4.3 Pozorované změny morfologie HUVEC po jejich ovlivnění 4,6-dichloropyrimidinovými deriváty

Byl vypořádkován silný vliv některých studovaných látek na adhezi a morfologii HUVEC (Obr. 19 a 20), který se projevil do 30 minut po přidání látek o koncentracích 25 $\mu\text{mol/l}$. Je tedy možné, že studované 4,6-dichloropyrimidonové deriváty inhibují tvorbu tubulárních struktur prostřednictvím zeslabení adheze endoteliálních buněk ovlivněním adhezních molekul.



Obr. 19: Morfologie HUVEC po ovlivnění látkami PJ-32A, PJ-32 a WQE-1, 50x zvětšeno.



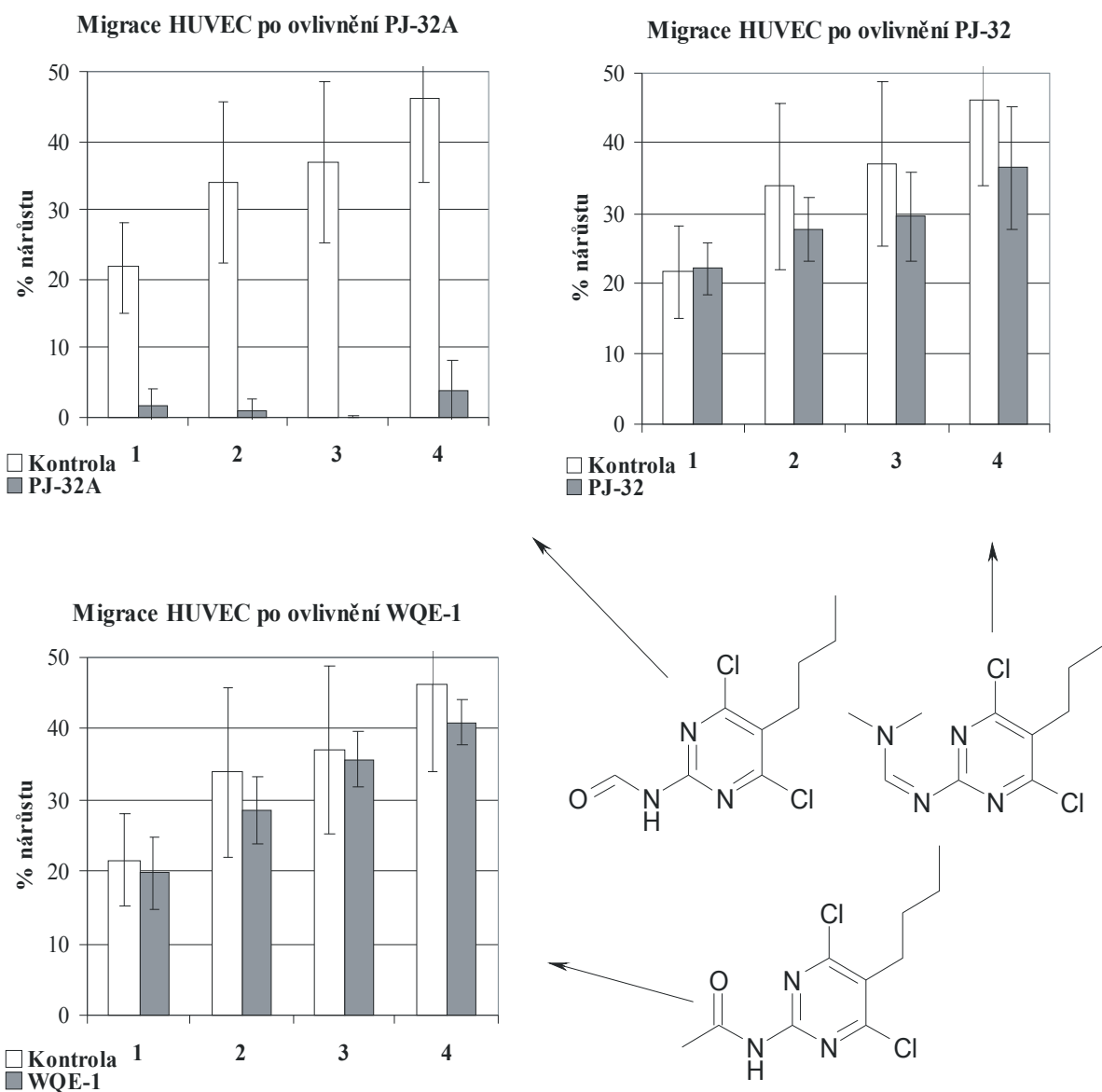
Obr. 20: Morfologie HUVEC po ovlivnění látkami PJ-23, PJ-24 a PJ-50, 50x zvětšeno.

Nejvýraznější změny morfologie HUVEC byly pozorovány po ovlivnění látkami PJ-23, PJ-24 a PJ-32A. Po ukončení působení látek a výměně média (za čerstvé médium bez látek) byla u buněk ovlivněných PJ-24 a PJ-32A pozorována jistá regenerace a obnovení adheze na kolagenový povrch. V případě PJ-23 tento efekt pozorován nebyl. U látek PJ-32, PJ-50 a WQE-1 nebyl pozorován žádný efekt na změny morfologie HUVEC.

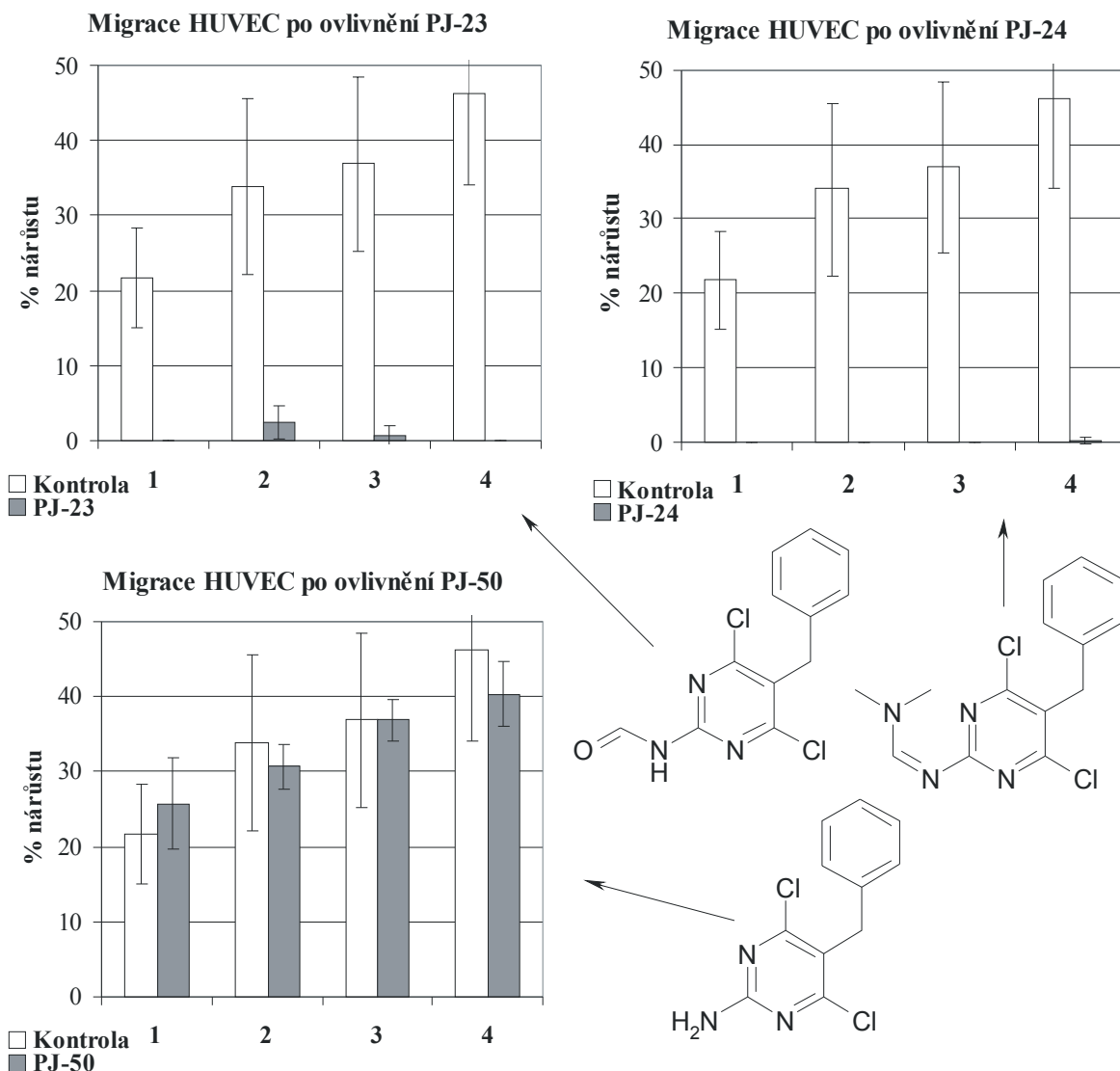
4.4 „Wound healing assay“

Do souvislé vrstvy endoteliálních buněk byly vytvořeny rýhy a byly pořízeny fotografie každé jamky v čase $t = 0$ hodin. Po 6-ti hodinové inkubaci bylo médium obsahující 25 μM látky vyměněno za čerstvé bez látek a jamky byly vyfoceny v čase $t = 6$ hodin. Dále byly jamky foceny v časech $t = 8, 10$ a 12 hodin.

Bylo pořízeno 5 fotografií pro každou jamku a daný čas. Postupné zarůstání rýh v časovém intervalu 0 až 12 hodin bylo vyhodnoceno programem ImageJ. Na obr. 21 a 22 je vyjádřeno jako procenta nárůstu vzhledem k původní ploše rýhy v čase $t = 0$ hodin. Tento experiment byl proveden dvakrát.



Obr. 21: Vliv PJ-32A, PJ-32 a WQE-1 (25 $\mu\text{mol/l}$) na migraci HUVEC. 1: $t = 6$ hodin, 2: $t = 8$ hodin, 3: $t = 10$ hodin, 4: $t = 12$ hodin. Data byla vyhodnocována z pěti různých fotografií pro každý čas a každou látku.



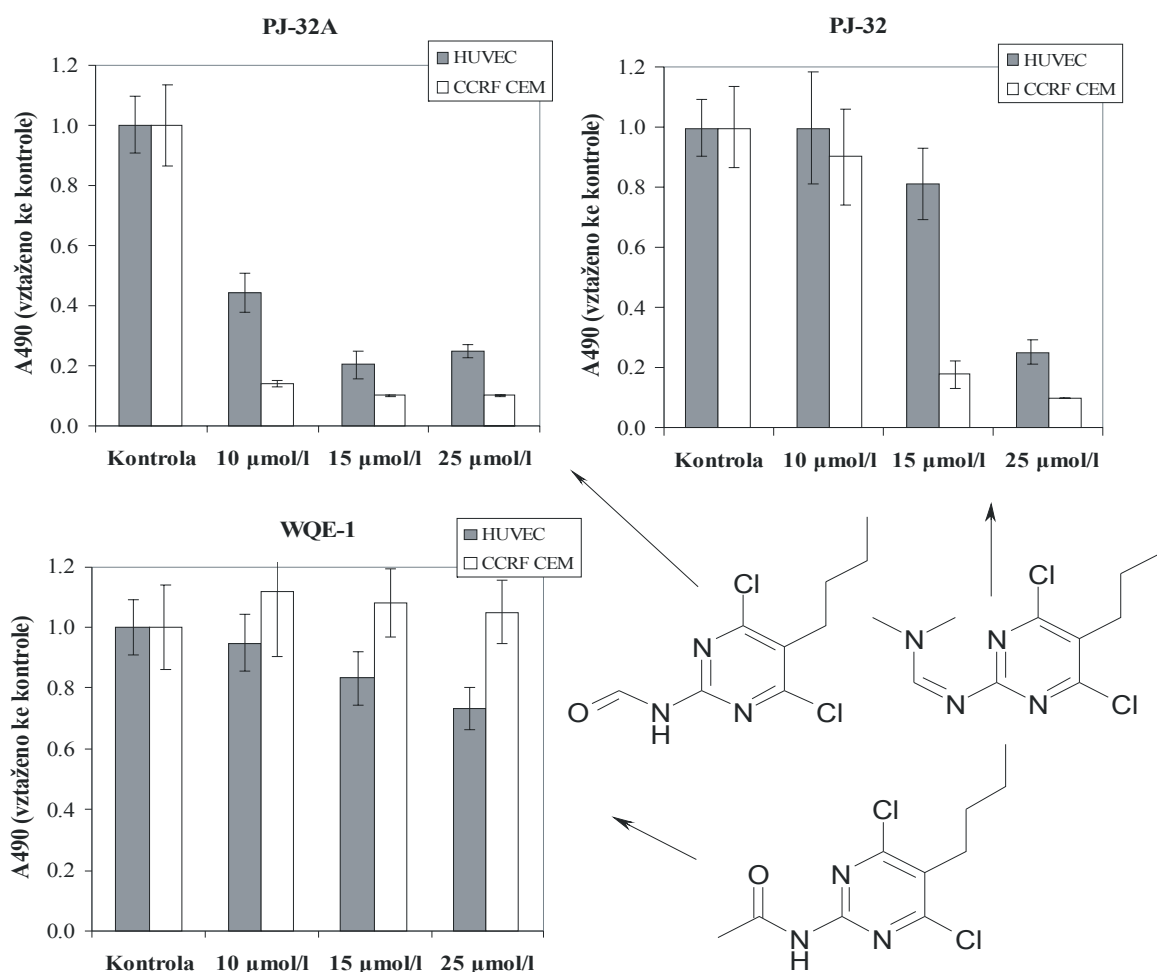
Obr. 22: Vliv PJ-23, PJ-24 a PJ-50 (25 $\mu\text{mol/l}$) na migraci HUVEC. 1: $t = 6$ hodin, 2: $t = 8$ hodin, 3: $t = 10$ hodin, 4: $t = 12$ hodin. Data byla vyhodnocována z pěti různých fotografií pro každý čas a každou látku.

Po 6-ti hodinovém působení studovaných látek na HUVEC u látek PJ-23, PJ-24 a PJ-32A nebyla pozorována migrace endoteliálních buněk. Tento účinek může být způsoben narušením adheze buněk ke kolagenovému povrchu, jak je patrné z obr. 19 a 20 v kapitole 4.4.

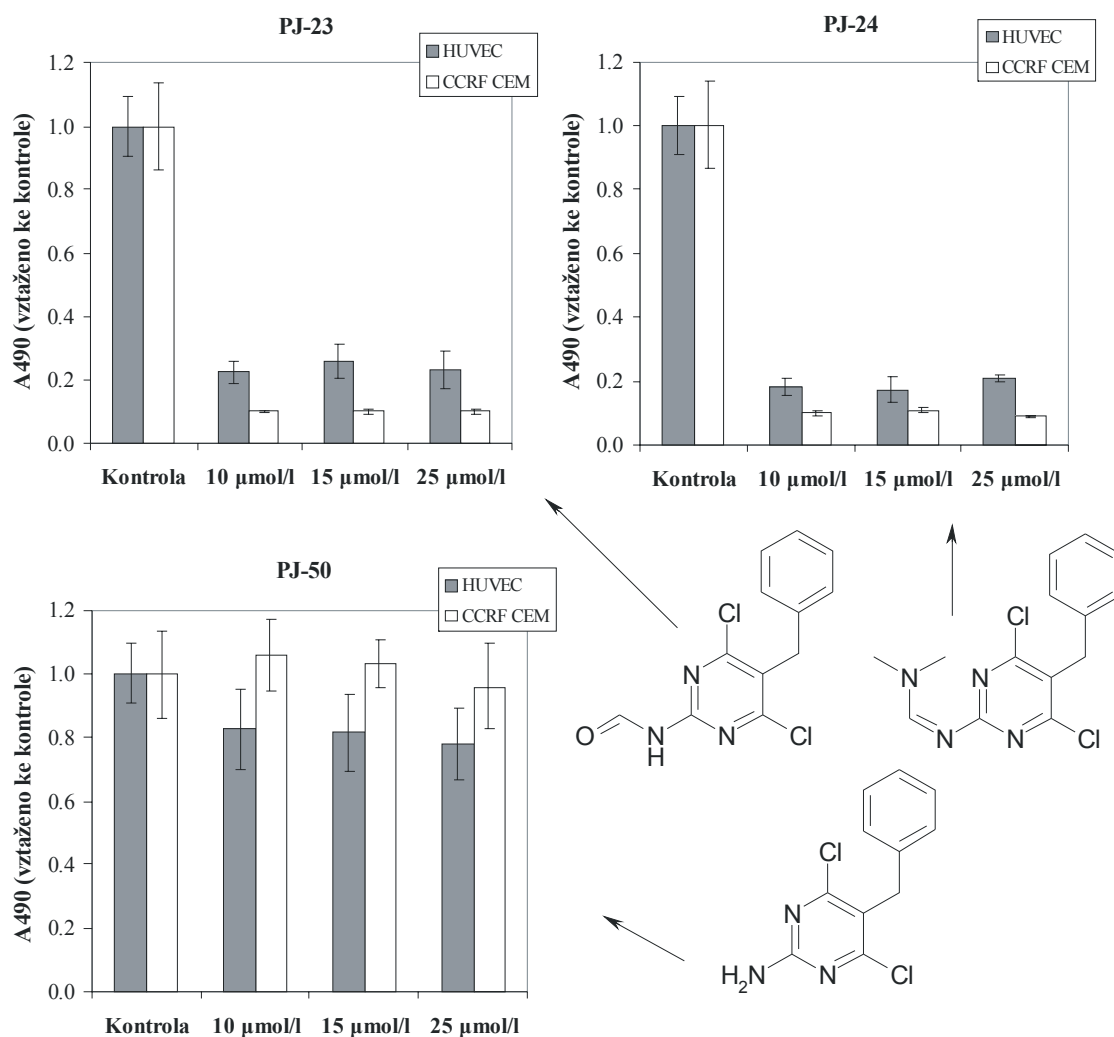
U látek PJ-32, PJ-50 a WQE-1 nebyl pozorován významnější účinek na migraci HUVEC. Tyto výsledky odpovídají pozorovaným morfologickým změnám HUVEC (viz. kapitola 4.4).

4.5 Inhibice buněčné proliferace

Vliv studovaných látek na buněčnou proliferaci byl sledován na buněčných liniích HUVEC a CCRF CEM pomocí kitu pro stanovení proliferace „Cell proliferation kit II (XTT)“. Doba inkubace buněk s látkami byla 72 hodin. Po té byla změřena absorbance dle postupu v kapitole 2.6.1. Stanovení bylo pro každý vzorek provedeno třikrát v kvadruplikátech. Naměřená data byla statisticky zpracována a byly z nich vyhotoveny grafy v programu MS Excel (Obr. 23 a 24).



Obr. 23: Vliv PJ-32A, PJ-32 a WQE-1 na buněčnou proliferaci HUVEC a CCRF CEM po 72 hodinách inkubace. Kontrola= neovlivněné buňky. A_{490} – absorpční maximum oranžového formazanu, absorbance je přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk. Provedena byla tři měření v kvadruplikátech, naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány.



Obr. 24: Vliv P-23, PJ-24 a PJ-50 na buněčnou proliferaci HUVEC a CCRF CEM po 72 hodinách inkubace. Kontrola = neovlivněné buňky. A_{490} – absorpční maximum oranžového formazanu, absorbance je přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk. Provedena byla tři měření v kvadruplikátech, naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány.

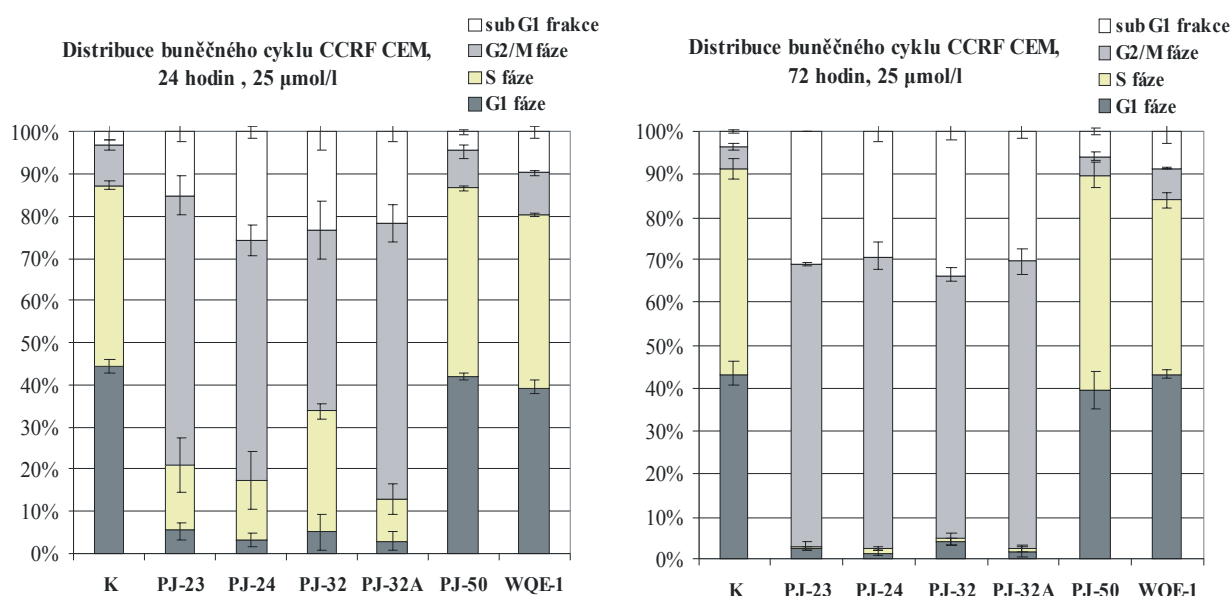
PJ-23, PJ-24, PJ-32 a PJ-32A snižují proliferaci u obou linií, přičemž buňky CCRF CEM jsou na tyto účinky citlivější než HUVEC. Vyšší citlivost CCRF CEM může souviset s rychlejším dělením této linie. Účinky látek na buněčnou proliferaci jsou koncentračně závislé. U látek PJ-23, PJ-24 a PJ-32A jsou naměřené hodnoty absorbance velmi nízké již při koncentraci 10 µmol/l. Tento efekt může být způsoben sníženou životností buněk po dlouhodobém působení těchto sloučenin.

Velmi mírný efekt PJ-50 a WQE-1 na proliferaci byl pozorován pouze u HUVEC. PJ-50 inhibovala proliferaci endoteliálních buněk z 20 % při všech koncentracích, WQE-1 dosahovala 20 % inhibice při koncentraci 25 µmol/l.

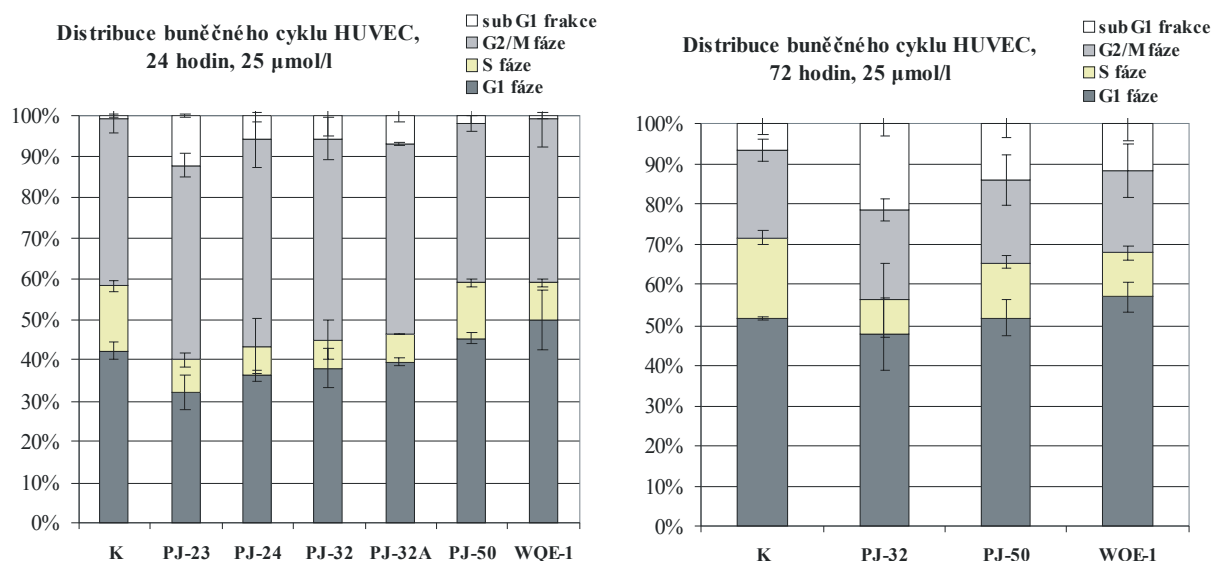
Z hlediska struktury studovaných sloučenin je možné, že důležitou funkční skupinou, která může být zodpovědná za sledované antiproliferační (případně cytotoxické) účinky, je funkční skupina v poloze 2 pyrimidinového kruhu. Zajímavou aktivitu vykazovaly sloučeniny s N,N'-dimethylaminomethylénamino-skupinou a formamino-skupinou v této poloze.

4.6 Distribuce buněčného cyklu HUVEC a CCRF CEM

Buňky byly vystaveny účinkům 25 μM studovaných sloučenin po dobu 24 a 72 hodin. Pro zjištění, zda látky působí změny v zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu byla použita analýza obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie (Obr. 25 a 26).



Obr. 25: Distribuce buněčného cyklu CCRF CEM po ovlivnění 24 a 72 hodin 25 μM látkami. K=kontrola, data byla vyhodnocena programem ModFit, statistické vyhodnocení bylo provedeno ze 3 experimentů.



Obr. 26: Distribuce buněčného cyklu HUVEC po ovlivnění 24 a 72 hodin 25 μ M látkami. K=kontrola, data byla vyhodnocena programem ModFit, statistické vyhodnocení bylo provedeno ze 3 experimentů.

Z výsledků je patrná zástava buněčného cyklu v G2/M fázi buněk CCRF CEM po ovlivnění látkami PJ-23, PJ-24, PJ32 a PJ-32A, přičemž tento efekt je pozorovatelný již po 24 hodinách a je výraznější po 72 hodinách. Významný podíl tvoří tzv. sub G1 frakce, která je spojována s apoptózou buněk. Naopak HUVEC po 24 hodinovém působení studovaných sloučenin nevykazují zásadní změny v distribuci buněčného cyklu. Nicméně po 72 hodinové inkubaci s PJ-23, PJ-24 a PJ 32A byl buněčný cyklus HUVEC velmi narušen. V případě těchto látek byla většina buněk v sub G1 frakci a nebylo možné tato data programem ModFit vyhodnotit.

5 Závěr

Náplní této bakalářské práce bylo studium antiangiogenních účinků vybraných 4,6-dichloropyrimidinových derivátů PJ-23, PJ-24, PJ-32, PJ-32A, PJ-50 a WQE-1. U této skupiny látek byl prokázán protizánětlivý účinek, jehož mechanismus není zatím objasněn. Je však známo, že patologická angiogeneze hraje důležitou roli v rozvoji zánětlivých stavů a při vývoji nádoru. Inhibice angiogeneze byla navržena jako slibný terapeutický přístup v léčbě těchto patologických stavů. Důležitou roli v angiogenezi a souvisejících zánětlivých procesech hrají endoteliální buňky. Studium účinků testovaných látek na klíčové kroky angiogenního procesu: proliferaci, migraci a diferenciaci endoteliálních buněk bylo tedy provedeno na lidských endoteliálních buňkách HUVEC ve snaze přispět k objasnění jejich protizánětlivých účinků.

V první fázi byly sledovány účinky těchto látek na diferenciaci HUVEC pomocí tzv. „tube formation assay“ - metody, která slouží jako *in vitro* model pro testování potenciálních inhibitorů angiogeneze. HUVEC vyseté na MatrigelTM byly vystaveny testovaným látkám o různých koncentracích (10 $\mu\text{mol/l}$ a 25 $\mu\text{mol/l}$). 6 hodin po ovlivnění byla sledována míra komplexity utvořených tubulárních struktur ve srovnání s kontrolou. U látek PJ-23, PJ-24 a PJ-32A byl na tomto modelu prokázán silný koncentračně závislý antiangiogenní účinek.

Pro objasnění případné role indukce apoptózy HUVEC buněk ve zjištěné inhibici tvorby tubulárních struktur po působení látek PJ-23, PJ-24 a PJ-32A bylo použito duálního značení buněk annexinem V-FITC a PI za stejných podmínek (6 hodin inkubace, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ a 25 $\mu\text{mol/l}$) a byla provedena stanovení podílu apoptotických buněk na průtokovém cytometru. Kromě látky PJ-23 nebyl počet apoptotických buněk v ostatních vzorcích významně navýšen. Získané výsledky tedy jednoznačně nepotvrdily apoptózu jako příčinu potlačení tvorby tubulárních struktur.

Následně byla sledována proliferační aktivita HUVEC 72 hodin po ovlivnění studovanými sloučeninami o koncentracích 10 $\mu\text{mol/l}$, 15 $\mu\text{mol/l}$ a 25 $\mu\text{mol/l}$. Pro srovnání byla použita i linie rychle se dělících lidských leukemických buněk CCRF CEM. Již 10 $\mu\text{mol/l}$ PJ-23, PJ-24 a PJ-32A ve srovnání s kontrolou snižovaly proliferační schopnost a zvyšovaly procento mrtvých buněk CCRF CEM. Tento efekt byl ještě prohlouben při koncentraci 25 $\mu\text{mol/l}$. Zároveň bylo zjištěno, že inhibice proliferace těmito látkami je silnější u rychle se dělících CCRF CEM buněk. Naopak PJ-50 a WQE-1 vykazují pouze mírné antiproliferační účinky na HUVEC, CCRF CEM jimi zůstávají neovlivněné.

Sledování vlivu testovaných sloučenin na migraci HUVEC bylo provedeno použitím tzv. „wound healing assay“. Buňky byly vystaveny účinku 25 μ M látek po dobu 6 hodin, přičemž nejvýraznější efekt byl pozorován opět u látek PJ-23, PJ-24 a PJ-32A. Pozorované výsledky korespondují s morfologickými změnami HUVEC.

Analýzou buněčného cyklu nebyla zjištěna výraznější změna distribuce buněčného cyklu HUVEC buněk ve srovnání s kontrolou po 24 hodinách. Nicméně v případě PJ-23, PJ-24 a PJ-32A došlo po 72 hodinách k tak výraznému nárůstu podílu apoptotické sub G1 frakce, že nebylo možné získaná data vyhodnotit. To naznačuje cytotoxický účinek těchto látek na endoteliální buňky při dlouhodobější inkubaci. Zajímavý byl efekt na distribuci buněčného cyklu v případě lidských leukemických CCRF CEM buněk. V tomto případě bylo zjištěno zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. Pomocí této metody není možné určit, zda se jedná o zastavení v G2 nebo v M fázi.

Další studium bude především zaměřeno na ovlivnění adheze endoteliálních buněk těmito látkami vzhledem k důležité roli adheze v angiogenezi.

6 Literatura

- [1] J. Folkman: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**: 1182-1186 (1971)
- [2] P. Kliner: Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění. *Klin. Onkol.* **23**: 14-20 (2010)
- [3] K. M. Leahy, A. T. Koki and J. L. Masferrer: Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Cur. Med. Chem.* **7**: 1163-1170 (2000)
- [4] J. P. Cooke, D. W. Losordo: Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* **105**: 2133-2135 (2002)
- [5] D. G. Binion, M. F. Otterson, P. Rafiee: Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut.* **57**: 1509-1517 (2008)
- [6] J. L. Masferrer et al.: Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenases-2 inhibitors. *Cancer Res.* **60**: 1306-1311 (2000)
- [7] M. Papetti, I. M. Herman: Mechanisms of normal and tumor derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C947–C970 (2002)
- [8] P. Gerwins, E. Sköldenberg, L. Claesson-Welsh: Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology:Hematology* **34**: 185–194 (2000)
- [9] J. Novotný, M. Zikán: Nádorová angiogeneze. *Klin. Farmakol. Farm.* **24**: 124-126 (2010)
- [10] S. Esser, M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, W. Risau: Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherine tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell. Biology* **110**: 2065-2077 (1998)
- [11] C. G. Kevil, D. K. Payne, E. Mire, J. S. Alexander: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J. Biol. Chem.* **273**: 15099-15103 (1998)
- [12] I. Spyridopoulos et al.: Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals. *J. Mol. Cell. Card.* **29**: 1321-1330 (1997)
- [13] E. J. Battegay, J. Rupp, L. Iruela-Arispe, E. H. Sage, M. Pech: PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J. Cell. Biol.* **125**: 917-28 (1994)

- [14] R. F. Nicosia, S. V. Nicosia, M. Smith: Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am. J. Pathol.* **145**: 1023-1029 (1994)
- [15] D. Gospodarowicz, N. Ferrara, L. Schweigerer, G. Neufeld: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* **8**: 95-114 (1987)
- [16] V.P. Terranova et al.: Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J. Cell. Biol.* **101**: 2330-2334 (1985)
- [17] R. Montesano, J. D. Vassalli, A. Baird, R. Guillemin, L. Orci: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7297-7301 (1986)
- [18] C. Suri et al.: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**: 1171-1180 (1996)
- [19] P.C. Maisonpierre et al.: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**: 55-60 (1997)
- [20] A. B. Schreiber, M. E. Winkler, R. Derynck: Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* **232**: 1250-1253 (1986)
- [21] M. Sund et al.: Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *PNAS* **102**: 2934-2939 (2005)
- [22] K. Hida, Y. Hida, M. Shindoh: Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti/angiogenic therapies. *Cancer Sci.* **99**: 459-466 (2008)
- [23] M. K. Gupta, R. Y. Qin: Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World. J. Gastroenterol.* **9**: 1144-1155 (2003)
- [24] S. V. Lutsenko, S. M. Kiselev, S.E. Severin: Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* **68**: 286-300 (2003)
- [25] <http://www.math.lsa.umich.edu/~tjacks/research.html>, 27. 7. 2012
- [26] D. R. Senger, C. A. Perruzzi, J. Feder, H. F. Dvorak: A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* **46**: 5629-5632 (1986)
- [27] Y. Takahashi et al.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* **55**: 3964-3968 (1995)
- [28] K. J. Kim et al.: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* **362**: 841-844 (1993)

- [29] A. Compagni, P. Wilgenbus, M. A. Impagnatiello, M. Cotten, G. Christofori: Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **60**: 7163-7169 (2000)
- [30] C. F. Deroanne et al.: Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **57**: 5590-5597 (1997)
- [31] J. Holash et al.: Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**: 1994-1998 (1999)
- [32] A. E. Koch, P. J. Polverini, S. J. Leibovich: Stimulation of neovascularization by human rheumatoid synovial tissue macrophages. *Arthritis Rheum.* **29**: 471-479 (1986)
- [33] M. Bar-Eli: Role of interleukin-8 tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* **67**: 12-18 (1999)
- [34] J. M. Ray, W. G. Stetler-Stevenson: Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *Embo J.* **14**: 908-917 (1995)
- [35] N. Nishida et al.: Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health. Risk. Manag.* **2**: 213-219 (2006)
- [36] R. T. Tong et al: Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* **64**: 3731-3736 (2004)
- [37] D. Marme, N. Fusenig: *Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy*. Berlin, Springer, 2008
- [38] M. Sund, M. Zeisberg, R. Kalluri: Endogenous stimulators and inhibitors of angiogenesis in gastrointestinal cancers: basic science to clinical application. *Gastroenterology* **129**: 2076-2091 (2005)
- [39] K. Hirota, G. L. Semenza: Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**: 15-26 (2006)
- [40] J. E. Ziello, I. S. Jovin, Y. Huang: Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *Yale J. Biol. Med.* **80**: 51-60 (2007)
- [41] A. Kaidi, D. Qualtrough, A. C. Williams, C. Paraskeva: Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.* **66**: 6683-6691 (2006)
- [42] L. Dieterich: Molecular regulation of inflammation and angiogenesis in the tumor microenvironment. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* (2011)

- [43] C. Sobolewski, C. Cerella, M. Dicato, L. Ghibelli, M. Diederich: The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell. Bio.* Article ID 215158, 21 stran (2010)
- [44] A. Kaidi, D. Qualtrough, A. C. Williams, Ch. Paraskeva: Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.* **66**: 6683-6691 (2006)
- [45] K.M. Leahy, A.T. Koki, J.L. Masferrer: Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Curr. Med. Chem.* **7**: 1163-1170 (2000)
- [46] S. Nematollahi et al.: Inducible nitric oxide synthase modulates angiogenesis in ischemic hindlimb of rat. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub* **153**: 125–130 (2009)
- [47] V Kostourou et al.: The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br. J. Cancer.* **104**: 83-90 (2011)
- [48] D. Fukumura et al.: Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *PNAS* **98**: 2604-2609 (2001)
- [49] D. Fukumura, S. Kashiwagi, R. K. Jain: The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev.* **6**: 521-534 (2006)
- [50] A. Papapetropoulos, G. García-Cardena, J. A. Madri, W. C. Sessa: Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **100**: 3131-3139 (1997)
- [51] P. Kliner: Význam inhibice angiogeneze v protinádorové léčbě. *Remedia* **15**: 4-5 (2005)
- [52] J. Folkman: Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* **112**: 496-507 (2004)
- [53] J. E. Nör et al: Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J. Vasc. Res.* **37**: 209-218 (2000)
- [54] N. E. Campbell, J. Greenway, J. Henkin, R. A. Moorehead, J. Petrik: The thrombospondin-1 mimetic ABT-510 increases the uptake and effectiveness of cisplatin and paclitaxel in a mouse model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* **12**: 275-283 (2010)
- [55] P. Falardeau, P. Champagne, P. Poyet, C. Hariton, E. Dupont: Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin. Oncol.* **28**: 620-625 (2001)
- [56] P. Kliner: Inhibice angiogeneze v léčbě zhoubných nádorů. *Farmakoterapie* **6**: 522-526 (2010)

- [57] <http://thatyossarian.hubpages.com/hub/Bevacizumab-Avastin-Information-Indications-and-Side-Effects>, 28.7.20012
- [58] J. Pešina: Avastin přesvědčivě prokazuje svou účinnost v léčbě pacientů s metastatickým CRC *Kolorektum* ISSN 1804-0888
- [59] J. Finek: Cetucimab (Erbix[®]) v léčbě kolorektálního karcinomu. *LL* **3** (2007)
- [60] L. Petruželka: Sunitinib v léčbě karcinomu ledviny. *Remedia* **17**: 211-215 (2007)
- [61] D. Huang: Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **70**: 1053-1062 (2010)
- [62] L. Petruželka: Sorafenib. *Remedia* **17**: 216-220 (2007)
- [63] M. Khaidakov, J. Szvedo, S. Mitra, J. L. Mehta: Angiostatic effects of aspirin in hypoxia-reoxygenation are linked to modulation of TGFβ1 signaling. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **16**:105-110 (2011)
- [64] M. Yao et al.: Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**: 1618-1628 (2005)
- [65] G. A. Fitzgerald, C. Patrono: The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* **365**: 433-442 (2001)
- [66] J. Vencovský, M. Procházková, T. Doležal: Celecoxibum. *Remedia* **14**: 18-32 (2004)
- [67] D. O. Stichtenoth, J. C. Frölich: The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? *Drugs* **63**: 33-45 (2003)
- [68] FDA Talk Paper (1998): Celecoxib: approved for treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: USA
- [69] R. O. Day, G. G. Graham: The vascular effect of COX-2 selective inhibitors. *Aust. Prescr.* **27**:142–145 (2004)
- [70] J. Michalowski: COX-2 Inhibitors: Cancer Trials Test New Uses for Pain Drug. *JNCI J Natl. Cancer Inst.* **94**: 248-249 (2002)
- [71] L. L. Thomsen et al: Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with <http://jnci.oxfordjournals.org/content/94/4.toc1400W> a novel inhibitor. *Cancer Res.* **57**: 3300-3304 (1997)
- [72] G. Y. Wang, B. Ji, X. Wang, J. H. Gu: Anti-cancer effect of iNOS inhibitor and its correlation with angiogenesis in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **11**: 3830-3833 (2005)

- [73] I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, G. Benton: The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* **12**: 267-274 (2009)
- [74] C. Y. Sasaki, A. Passaniti: Identification of anti-invasive but noncytotoxic chemotherapeutic agents using the tetrazolium dye MTT to quantitate viable cells in Matrigel. *Biotechniques* **24**:1038-43 (1998)
- [75] B. Branská, M. Linhová, P. Patáková, L. Paulová, K. Melzoch: Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chem. Listy* **105**: 586-593 (2011)
- [76] Invitrogen, dostupné z URL: <<http://www.invitrogen.com/1/1/11457-calcein-am.html>> [cit. 6.8.2012]
- [77] L. G. Rodriguez, X. Wu, J. L. Guan: Wound-healing assay. *Cell Migration, Wound-healing assay*. 23-29 (2005)
- [78] z produktového listu: Cell proliferation kit II (XTT), katalogové číslo: 11465015001
- [79] M. Brown, C. Wittwer: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* **46**: 1221-1229
- [80] B. Alberts et al: *Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání, Espero Publishing 2005
- [81] J. Hruša: *Vliv metabolického stavu buňky na vnímavost k apoptóze indukované oxidačním stresem*, disertační práce. Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita Brno. 2010
- [82] T. C. George, P. J. Morrissey, C. Cui, S. Singh, P. Fitzgerald Bocarsly: Measurement of cytoplasmic to nuclear translocation. *Curr. Protocols Cytom.* **47**: 9.28.1-9.28.15
- [83] E. Bertl, H. Bertsch, C. Gehäuser: Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanism in chemoprevention. *Mol. Cancer Ther.* **5**: 575-585 (2006)
- [84] J. Kabir, M. Lobo, I. Zachary: Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem. J.* **367**: 145-155 (2002)